

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**VALIDAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM NOVO MODELO  
COMPORTAMENTAL INTEGRADO DE  
ANSIEDADE/EMOCIONALIDADE EM RATOS**

THAIZE DEBATIN WEHRMEISTER

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André de Ávila Ramos

Florianópolis  
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

W414v Wehrmeister, Thaize Debatin

Validação farmacológica de um novo modelo comportamental integrado de ansiedade/emocionalidade em ratos [dissertação] / Thaize Debatin Wehrmeister ; orientador, André de Ávila Ramos. - Florianópolis, SC , 2010.

73 p.: il., graf.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Ansiedade. 3. Labirinto em cruz elevado. 4. Campo aberto. 5. One trial tolerance. 6. Rato. I. Ramos, André de Ávila. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

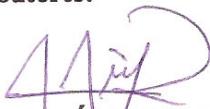
CDU 615

**“Validação farmacológica de um novo modelo  
comportamental integrado de ansiedade/emocionalidade em  
ratos”**

**POR**

**THAIZE DEBATIN WEHRMEISTER**

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros da Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores:**



**André de Ávila Ramos  
Presidente (FMC/UFSC)**



**Hélio Zangrossi Junior  
USP/RP**



**Leandro José Bertoglio  
FMC/UFSC**



**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC**

**Florianópolis, 05 de março de 2010.**

A meus pais, Roberto e Albertina;  
A meu marido, Fernando;  
A minha avó, Valmira Margarida da Silva (*in memoriam*),  
pelo bem mais precioso, o amor.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Roberto e Albertina, pelos ensinamentos mais preciosos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A meu marido, Fernando, pela paciência, companheirismo e apoio em todos os momentos. Por acreditar em mim e me fortalecer diante dos obstáculos. Pelas contribuições para este trabalho. Sem você o caminho seria muito mais árduo.

Ao professor Dr. André de Ávila Ramos, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação.

Aos professores Dr. Hélio Zangrossi Jr, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Antônio de Pádua Carobrez por aceitarem participar desta banca e pela colaboração no aprimoramento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Ao grande amigo, Geison, por ouvir com atenção e paciência minhas viagens científicas, pelos maravilhosos momentos de discussão e troca de idéias, pelas valiosas contribuições para este trabalho.

A querida Elayne, pela dedicação em todos os momentos, pela amizade e apoio, pelas contribuições para este trabalho.

Ao Jonatas, por ajudar nos cuidados com os animais de experimentação, pela educação, humildade e apoio.

Aos colegas de laboratório, Gabriela, Gustavo e Letícia, pelo apoio e amizade.

A minha grande amiga e irmã adotiva, Alessandra, pelo amor, confiança e apoio.

A Cris Stern e Stefanie, pela confiança e amizade.

A Lady, pelo carinho, ternura e momentos de alegria.

A Ana Paula, Aninha, Cris C., Cris M., Evelyn, Filipe, Lucas, Kathryn, Rose e todos aqueles que foram importantes nesta trajetória.

A Nelson e Berta, pelo carinho e diferentes contribuições.

Aos funcionários e demais colegas da pós-graduação.

Aos animais de experimentação, pela contribuição científica que eles proporcionam.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

“Para cada um de nós, cada trajetória de busca pessoal dispõe de um lugar no espaço-tempo do universo. Cada existência tem uma função a desempenhar na grande coreografia cósmica da história humana. Andamos à nossa procura através de saltos sucessivos, três passos para frente e, às vezes, dois para trás, quando não é necessário dar um salto para o lado. A busca sem fim do melhor de si move-se no enclave de liberdade que se oferece a cada um, entre dívida e crédito, submissão e autonomia, na orla do definido e do indefinido, do passado e de seu devir, entre o oriente e o poente de cada ser”.

Jacques Salomé

## RESUMO

Vários testes existem para medir comportamentos relacionados à ansiedade em roedores de laboratório. Entretanto, a interpretação dos parâmetros e o entendimento dos comportamentos observados nestes testes ainda não são satisfatórios. Para uma avaliação mais completa do perfil emocional dos animais é interessante utilizar diferentes testes e medidas comportamentais. Porém, o mesmo animal não pode ser testado ao mesmo tempo em diferentes testes comportamentais. Para tentar resolver esta questão, foi proposto o teste triplo, que integra três testes comportamentais, o campo aberto (CA), o labirinto em cruz elevado (LCE), e a caixa branca/preta (CBP). No presente trabalho foi verificado o efeito do tratamento agudo com os ansiolíticos benzodiazepínicos midazolam (MDZ 0,187, 0,375 e 0,75 mg/kg) e clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg), e com o ansiogênico pentilenotetrazol (PTZ 10 e 20 mg/kg) no teste triplo. Ainda foi avaliado o efeito da administração aguda de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg) no CA e na CBP individualmente e o efeito da administração repetida de CDZ (10 mg/kg) em três protocolos: teste/reteste, quatro dias de exposição repetida e vinte dias de exposição repetida ao teste triplo. Nossos resultados demonstraram que o teste triplo provê índices relacionados à ansiedade, pois responde aos tratamentos com MDZ, CDZ e PTZ. A ausência de *one trial tolerance*, neste paradigma, o torna sensível também ao tratamento crônico com CDZ. Estes dados apontam o teste triplo como uma ferramenta promissora na avaliação de drogas ansiolíticas administradas de forma aguda e crônica. O efeito ansiolítico do CDZ, demonstrado através do aumento na exploração das áreas aversivas do LCE pelos animais tratados, também em exposições repetidas, sugere a presença de uma nova situação de conflito motivacional no teste triplo, o que também apóia a hipótese de ocorrência de uma aprendizagem aversiva e/ou de uma mudança no estado emocional do animal no fenômeno de *one trial tolerance*. A ausência de efeito do MDZ e do CDZ no CA e na CBP, individualmente e no teste triplo, indicam que, nas nossas condições experimentais, os testes comportamentais (CA, LCE, CBP) avaliam diferentes características emocionais ou ainda, que o CA e a CBP não são consistentemente sensíveis aos BDZs em ratos.

**Palavras-chave:** ansiedade, labirinto em cruz elevado, campo aberto, caixa branca e preta, *one trial tolerance*, ratos

## ABSTRACT

There are several behavioral tests to assess anxiety-related behaviors in rodents. However, the interpretation and understanding of the observed behaviors are still unsatisfactory. For a more complete evaluation of an animals emotional profile, it is interesting to use different tasks and behavioral measures. However, the same animal cannot be treated at same time in different behavioral test. To address this issue, we proposed the triple test, an apparatus which integrates three behavioral anxiety tests: the open field (OF), the elevated plus maze (EPM) and the black/white box (BWB). The aim of the study was to evaluate the effect of acute treatment with the benzodiazepines midazolam (MDZ 0.187, 0.375 e 0.75 mg/kg) and chlordiazepoxide (CDZ 0.5, 5 e 10 mg/kg) and with pentylenetetrazole (PTZ 10 e 20 mg/kg) in Wistar rats. After that, we evaluated the effect of acute administration of CDZ (0.5, 5 e 10 mg/kg) in the OF and BWB and the effect of repeated administration of CDZ (10 mg/kg) in three protocols: test/retest, four days of repeated exposition and twenty days of repeated exposition to the triple test. The main results showed that the triple test provides indices that are related to anxiety, because the MDZ, CDZ and PTZ treatments were effective. The absence of one- trial tolerance shows that the triple test is sensible to chronic treatment with CDZ. This data suggests that the triple test is a promising tool to evaluate acute and chronic treatments with anxiolytic drugs. The CDZ anxiolytic effect shown by the increase in the EPM aversive areas exploration, also in repeated testing, suggests the presence of a new situation of motivational conflict in the triple test, supporting the hypothesis of an aversive learning and/or a change in emotional status of animal during the one trial tolerance phenomenon. The absence of MDZ and CDZ effect in the OF and BWB, individually and in the triple test, indicates that, in our experimental conditions, the behavioral tests (OF, EPM and BWB) assess different emotional characteristics or that the OF and BWB are not sensitive to BDZs in rats.

**Key-words:** anxiety, elevated plus maze, open field, black/white box, one trial tolerance, rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Campo Aberto utilizado nos experimentos .....	17
<b>Figura 2.</b> Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos ...	18
<b>Figura 3.</b> Caixa Branca/Preta utilizada nos experimentos .....	19
<b>Figura 4.</b> Teste Triplo utilizado nos experimentos .....	20
<b>Figura 5.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de midazolam (MDZ 0,187, 0,375 ou 0,75 mg/kg) no teste triplo .....	26
<b>Figura 6.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de midazolam (MDZ 0,187, 0,375 e 0,75 mg/kg) no teste triplo .....	27
<b>Figura 7.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg) no teste triplo .....	29
<b>Figura 8.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg) no teste triplo .....	30
<b>Figura 9.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de pentilenotetrazol (PTZ 10 ou 20 mg/kg) no teste triplo .....	32
<b>Figura 10.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de pentilenotetrazol (PTZ 10 ou 20 mg/kg) no teste triplo .....	33
<b>Figura 11.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade (azul) e a locomoção (escala de cinza) de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 ou 10 mg/kg) no CA .....	35
<b>Figura 12.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade (azul) e a locomoção (escala de cinza) de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 ou 10 mg/kg) na CBP .....	36
<b>Figura 13.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos	

Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em dois dias de experimento no teste triplo .....	38
<b>Figura 14.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em dois dias de experimento no teste triplo .....	39
<b>Figura 15.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em quatro dias de experimento no teste triplo .....	41
<b>Figura 16.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em quatro dias de experimento no teste triplo .....	42
<b>Figura 17.</b> Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em vinte dias de experimento no teste triplo .....	45
<b>Figura 18.</b> Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em vinte dias de experimento no teste triplo .....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BDZs – Benzodiazepínicos

CA – Campo aberto

CBP – Caixa branca e preta

CDZ – Clordiazepóxido

Cl<sup>-</sup> - Íon cloro

LCE – Labirinto em cruz elevado

MDZ – Midazolam

MC – Metilcelulose

PTZ – Pentilenotetrazol

OTT – *One trial tolerance*

SCPd – Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

SNC – Sistema nervoso central

TZ – Triazolam

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1.1 Ansiedade</b> .....	01
<b>1.2 Testes comportamentais</b> .....	02
1.2.1 Campo Aberto (CA) .....	04
1.2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	05
1.2.3 Caixa Branca e Preta (CBP) .....	06
<b>1.3 Limitações dos Testes Comportamentais</b> .....	07
<b>1.4 Fenômeno de “One Trial Tolerance”</b> .....	09
<b>1.5 Propostas para Minimizar as Limitações dos Testes Comportamentais</b> .....	12
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
<b>4.1 Animais</b> .....	17
<b>4.2 Aparatos Comportamentais</b> .....	17
4.2.1 Campo Aberto (CA) .....	17
4.2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	18
4.2.3 Caixa Branca e Preta (CBP) .....	18
4.2.4 Teste Triplo .....	19
<b>4.3 Drogas</b> .....	20
<b>4.4 Protocolos Experimentais</b> .....	21
4.4.1 Experimento 1: Efeito do MDZ no Teste Triplo .....	21
4.4.2 Experimento 2: Efeito do CDZ no Teste Triplo .....	22
4.4.3 Experimento 3: Efeito do PTZ no Teste Triplo .....	22
4.4.4 Experimento 4: Efeito do CDZ no CA .....	22
4.4.5 Experimento 5: Efeito do CDZ na CBP .....	23
4.4.6 Experimento 6: Efeito do Reteste nos Efeitos do CDZ no Teste Triplo .....	23
4.4.7 Experimento 7: Efeito do CDZ em 4 Dias de Exposição Repetida ao Teste Triplo .....	23
4.4.8 Experimento 8: Efeito Crônico do CDZ no Teste Triplo.....	24

4.5 <i>Análise Estatística</i> .....	24
<b>5. RESULTADOS</b> .....	25
5.1 <i>Experimento 1: Efeito do MDZ no Teste Triplo</i> .....	25
5.2 <i>Experimento 2: Efeito do CDZ no Teste Triplo</i> .....	28
5.3 <i>Experimento 3: Efeito do PTZ no Teste Triplo</i> .....	31
5.4 <i>Experimento 4: Efeito do CDZ no CA</i> .....	34
5.5 <i>Experimento 5: Efeito do CDZ na CBP</i> .....	36
5.6 <i>Experimento 6: Efeito do Reteste nos Efeitos do     CDZ no Teste Triplo</i> .....	37
5.7 <i>Experimento 7: Efeito do CDZ em 4 Dias de     Exposição Repetida ao Teste Triplo</i> .....	40
5.8 <i>Experimento 8: Efeito Crônico do CDZ no Teste     Triplo</i> .....	43
5.9 <i>Análise do Tempo Total em Cada Aparato do Teste     Triplo</i> .....	47
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62



# 1. INTRODUÇÃO

## *1.1 Ansiedade*

A ansiedade é uma emoção onde a combinação de reações somáticas, cognitivas e comportamentais se manifestam como um mecanismo adaptativo de sobrevivência (HOHOFF, 2009). Pode ser também definida como um estado cognitivo ou preparação comportamental que um organismo mobiliza em resposta a uma ameaça potencial ou futura (LEONARDO e HEN, 2008). Portanto, a ansiedade faz parte do espectro normal das experiências humanas (ANDRADE e GORENSTEIN, 1998) e divide-se, segundo alguns autores, em duas formas: ansiedade traço, que é uma característica permanente no indivíduo; e ansiedade estado, que é temporária e, portanto, acontece em determinado momento no tempo (LISTER, 1990). Esta visão dicotômica, no entanto, tem sido criticada, já que um indivíduo não pode ser ansioso sempre, pois suas emoções flutuam ao longo do tempo; porém, ele pode ser ansioso mais frequentemente do que outros (RAMOS e MORMÊDE, 1998; RAMOS, 2008). De acordo com esta visão, para medir os traços de ansiedade, teríamos que avaliar quão frequentemente (ou intensamente) um indivíduo experimenta estados ansiosos (RAMOS, 2008).

As reações de ansiedade em mamíferos, incluindo os seres humanos, são mediadas por estruturas encefálicas como amígdala, hipocampo, córtex cingulado, hipotálamo, e várias áreas do tronco cerebral (GORDON e HEN, 2004). Tais reações envolvem a participação de alguns neurotransmissores, entre os quais destacam-se o ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), a serotonina, o glutamato, canabinóides e neuropeptídeos (CANTERAS e BLANCHARD, 2008).

Sob certas circunstâncias, a ansiedade normal pode dar lugar a respostas excessivas e inadequadas, prevalecendo uma personalidade ansiosa ou, até mesmo, um transtorno de ansiedade (HOHOFF, 2009). Neste caso, a ansiedade é considerada patológica, representando um processo de má adaptação e prejudicando a capacidade do organismo de responder de forma adequada a seu ambiente (LEONARDO e HEN, 2008). Segundo o DSM-IV-TR<sup>TM</sup> (2002) os transtornos de ansiedade se classificam em transtorno de pânico com e sem agorafobia, agorafobia, fobia específica, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade devido a

uma condição médica geral ou induzido por uma substância, ou ainda, sem outra especificação.

Os transtornos de ansiedade apresentam alta prevalência e estão associados a elevados níveis de morbidade e mortalidade (LEONARDO e HEN, 2008). Também estão entre os mais estudados transtornos psiquiátricos em seres humanos (LIPKIND *et al*, 2004). São comuns tanto em crianças quanto em adultos, com prevalência estimada na vida de 9% e 15%, respectivamente (CASTILLO *et al*, 2000). Estima-se que cerca de 17% dos brasileiros são afetados ao menos uma vez durante a vida por algum transtorno de ansiedade (WHO, 2000). Devido à grande prevalência dos transtornos de ansiedade nos seres humanos, grandes esforços têm sido direcionados para a compreensão das bases biológicas dessas doenças (GERLAI, BLANCHARD E BLANCHARD, 2006). Desta forma, os testes comportamentais representam uma ferramenta importante para ajudar nesta compreensão.

### ***1.2 Testes Comportamentais***

Os testes comportamentais representam uma valiosa ferramenta para investigar os fenômenos envolvidos na ansiedade e nos seus transtornos. Como a estrutura geral do cérebro dos mamíferos é semelhante em várias espécies (GERLAI, BLANCHARD E BLANCHARD, 2006), ocorre uma notável similaridade entre elas a nível anatômico, fisiológico, comportamental, bioquímico e molecular (LEONARDO e HEN, 2008; HOHOFF, 2009), o que permite supor que algumas das características neurobiológicas dos mecanismos subjacentes à ansiedade estejam evolutivamente conservados (GERLAI, BLANCHARD E BLANCHARD, 2006). Porém, estas semelhanças não permitem sugerir que o roedor apresenta ansiedade patológica, pois este transtorno é tipicamente humano. Apesar disso, seres humanos normais e roedores de laboratório apresentam reações autonômicas e comportamentais de defesa que são relativamente semelhantes diante de uma ameaça potencial (BLANCHARD *et al*, 2008; HOHOFF, 2009). A partir destas semelhanças, a investigação pré-clínica em animais tem sido fundamental para nossa compreensão atual da ansiedade, delineando os mecanismos neurais e psicofarmacológicos envolvidos na resposta defensiva à ameaça (GRILLON, 2008). Segundo Bourin *et al*. (2007), podem haver três formas de validade em um modelo animal: (a) validade de aparência (*face validity*), que implica que a resposta

comportamental observada no modelo animal seja semelhante a resposta fisiológica e comportamental observada nos seres humanos; (b) validade preditiva (*predictive validity*), que implica que o modelo animal apresente sensibilidade a agentes farmacológicos clinicamente eficazes; (c) validade de construção (*construct validity*), que implica que os fatores comportamentais e biológicos observados no modelo apresentem a mesma origem da etiologia da doença em humanos. Portanto, para que um teste possa ser considerado um modelo comportamental de ansiedade, ele deve permitir a mensuração de respostas quantitativas/qualitativas em animais que, não apenas devem ser análogas à condição clínica humana, em forma e origem etiológica, mas também devem responder à aplicação de drogas ansiolíticas/ansio gênicas no mesmo sentido em que estas drogas atuam em humanos (FILE, 1987).

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos com base na sua sensibilidade aos compostos benzodiazepínicos (BDZs) (HASCOËT, BOURIN e DHONNCHADHA, 2001). Os BDZs são drogas de primeira linha para o tratamento dos transtornos de ansiedade (BALDWIN e GARNER, 2008). Entretanto, são mais eficazes para o transtorno de ansiedade generalizada, quando comparados a outros transtornos de ansiedade (FILE, GONZALEZ e GALLANT, 1999). Eles são considerados relativamente seguros para os seres humanos (ZHANG e CARNNEY, 2008) e já demonstraram esta segurança também nos testes com animais (CRAWLEY, 1981; PELLOW *et al*, 1985). Esta classe de drogas age ao se ligar a um sítio específico no complexo receptor GABA<sub>A</sub>, aumentando a neurotransmissão de GABA (FIDECKA e PIROGOWICZ, 2002), o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) (RANG, DALE e RITTER, 2001). Conseqüentemente, eles provocam uma alteração conformacional no receptor que aumenta a frequência de abertura do seu canal Cl<sup>-</sup> (NICOLL, MALENKA e KAUER, 1990). Esses fatores levam aos efeitos mais proeminentes dos BDZs, que incluem, sedação, diminuição da ansiedade, hipnose ou atividade anticonvulsivante (FIDECKA e PIROGOWICZ, 2002).

Os testes comportamentais foram desenvolvidos para facilitar a descoberta dos genes e das vias neurobiológicas envolvidas nos comportamentos relacionados à ansiedade, bem como, para a triagem de potenciais agentes terapêuticos (RODGERS, 1997; LIPKIND *et al*, 2004). Existem dois tipos de testes comportamentais, aqueles baseados em respostas condicionadas, que envolvem aprendizagem e memória e,

algumas vezes, eventos dolorosos (ex: choque elétrico); e aqueles baseados em respostas incondicionadas, que incluem paradigmas etológicos e que envolvem reações espontâneas ou naturais do animal a estímulos ameaçadores (GORDON e HEN, 2004; BOURIN et al, 2007). Os modelos condicionados, envolvendo estímulos físicos nocivos, têm sido freqüentemente criticados (para revisão ver RAMOS e MORMÈDE, 1998). Já os modelos incondicionados, são amplamente utilizados, devido à facilidade de construção, baixo custo e quantificação simples e rápida das medidas comportamentais (WALSH e CUMMINS, 1976; LISTER, 1990; CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Dentre estes modelos podemos citar o campo aberto (CA), o labirinto em cruz elevado (LCE) e a caixa branca e preta (CBP), que foram utilizados no presente estudo e estão descritos sucintamente abaixo. Revisões aprofundadas podem ser encontradas em Walsh e Cummins (1976), Prut e Belzung (2003), Bourin e Hascoët (2003), Carobrez e Bertoglio (2005).

### ***1.2.1 Campo Aberto (CA)***

Desde a sua introdução, em 1934, por Calvin Hall, o teste do CA atingiu o status de um dos aparatos mais utilizados em psicologia animal (HALL, 1934; WALSH e CUMMINS, 1976). O aparato consiste de uma arena cercada por paredes, impedindo a fuga do animal, e com o chão marcado por linhas que permitem quantificar a locomoção, onde o animal é colocado e pode explorar o aparato livremente por uma certa quantidade de tempo. Diferentes versões do CA estão descritas na literatura, diferenciando-se entre si no que diz respeito à forma (circular, quadrado ou retangular), iluminação (iluminação acima do aparato ou abaixo, neste último caso, o aparato é transparente), cor e material (WALSH e CUMMINS, 1976; LISTER, 1990; PRUT e BELZUNG, 2003). Adicionalmente, o CA tem sido utilizado em inúmeras espécies, desde ratos e camundongos até porcos, ovelhas, coelhos, primatas, abelhas e lagostas (PRUT e BELZUNG, 2003).

À época, Hall utilizou a defecação de ratos no CA como índice de emocionalidade (HALL, 1934). Posteriormente, outros estudos com o CA incluíram outras medidas comportamentais como: locomoção, micção, congelamento (*freezing*), auto-limpeza (*grooming*), exploração de pé (*rearing*), vocalização, entre outras (ARCHER, 1973; WALSH e CUMMINS, 1976). Atualmente, o CA é utilizado para medir

comportamentos relacionados à ansiedade (HALL, 1934; PRUT e BELZUNG, 2003; LIPKIND *et al*, 2004; LITVIN *et al*, 2008), à atividade locomotora e à sedação (PRUT e BELZUNG, 2003), as reações de novidade e memória (ENNACEUR *et al*, 2006), além de ser um dos testes mais utilizados na pesquisa de camundongos geneticamente modificados (LIPKIND *et al*, 2004).

A utilização do CA para medir comportamentos relacionados à ansiedade pode envolver a distinção do aparato em área central e periférica. A área central é desprovida de paredes, enquanto que a área periférica é adjacente às paredes do aparato. Normalmente, os roedores são mais ativos e permanecem mais tempo na periferia do aparato em comparação com a área central, principalmente na primeira sessão (VALLE, 1970). Isto ocorre porque a locomoção junto à parede permite a realização de tigmotaxia (VALLE, 1970; PRUT e BELZUNG, 2003), entendida como uma reação de defesa natural, na qual os roedores passam suas vibrissas sobre superfícies verticais, dando a sensação de menor exposição, e, portanto, de estarem protegidos de um eventual ataque por predador (BARNETT, 1975; TREIT, MENARD e ROYAN, 1993). Neste sentido, a locomoção na periferia do aparato tem uma conotação exploratória, enquanto que a locomoção no centro tem uma conotação emocional, um comportamento frente a uma situação aversiva. O aumento na locomoção e no tempo gasto na área central ou a diminuição da latência para entrar na área central do CA são indicadores de diminuição da ansiedade (PRUT e BELZUNG, 2003). Drogas ansiolíticas tendem a aumentar a locomoção e o tempo de permanência na área central do CA, enquanto drogas ansiogênicas apresentam o resultado contrário (GENTSCH, LICHTSTEINER e FEER, 1987). Apesar destas medidas comportamentais que envolvem aproximação e esquiva da área central, contribuírem para a distinção de uma locomoção geral de uma locomoção com maior componente emocional, nem sempre são consideradas em estudos de emocionalidade (RAMOS e MORMÊDE, 1998).

### ***1.2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)***

O LCE foi desenvolvido por Handley e Mithani no ano de 1984, baseado no trabalho inicial de Montgomery (1955) sobre a relação entre medo induzido pela novidade e comportamento exploratório (MONTGOMERY, 1955; HANDLEY e MITHANI, 1984; ROY *et al*, 2009).

Posteriormente, o teste foi validado em ratos por Pellow e colaboradores em 1985, através do uso de abordagens comportamentais, fisiológicas e farmacológicas (PELLOW *et al*, 1985). Em 1987, foi validado também em camundongos por Lister (LISTER, 1987; LISTER, 1990). Constitui um dos testes comportamentais de ansiedade mais populares na atualidade (RODGERS e SHEPHERD, 1993; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005), representando o teste de primeira escolha para o monitoramento de drogas ansiolíticas (RAMOS, 2008).

O aparato consiste de quatro braços elevados do chão, dispostos em cruz, dois braços opostos são fechados e, os outros dois, também opostos, são abertos. Possui em sua intersecção, uma plataforma central que dá acesso a qualquer um dos quatro braços, na qual o animal é colocado no início da sessão de teste. Permite medir comportamentos relacionados à ansiedade baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos, levando a um conflito entre permanecer nos braços fechados (parte segura e protegida) e explorar os braços abertos (parte aversiva e desprotegida) (MONTGOMERY, 1955; FILE, 1995; GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009, ROY *et al*, 2009). O LCE é sensível principalmente a drogas que atuam nos sistemas benzodiazepínico/GABAérgico (RODGERS, 1997; CAROBREZ, TEIXEIRA e GRAEFF, 2001; LITVIN *et al*, 2008), sendo consideradas ansiolíticas aquelas drogas capazes de aumentar a atividade nos braços abertos e ansiogênicas aquelas que reduzem essa atividade (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Neste sentido, tornou-se um dos testes mais confiáveis para investigar e medir comportamentos relacionados à ansiedade em laboratório (ALBRECHET-SOUZA, BORELLI e BRANDÃO, 2008). Além de ser utilizado na triagem de potenciais agentes terapêuticos, o LCE contribui para a compreensão das bases biológicas envolvidas nos processos emocionais e tem sido usado para definir as regiões cerebrais envolvidas nos processo de medo e ansiedade (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

### ***1.2.3 Caixa Branca e Preta (CBP)***

A CBP, também conhecida como teste de transição claro/escuro, foi desenvolvida por Crawley e Goodwin em 1980 (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Consiste de uma pequena caixa com dois compartimentos conectados, um branco fortemente iluminado e outro preto com baixa iluminação (vermelha). Ao iniciar a sessão de teste o

animal é colocado no compartimento branco e pode explorar livremente os dois compartimentos. O número de transições realizadas por camundongos entre os dois compartimentos (claro/escuro) foi utilizado como um índice de ansiedade (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). Posteriormente, Crawley demonstrou em seus experimentos que alguns compostos benzodiazepínicos aumentavam o comportamento exploratório de camundongos na CBP (CRAWLEY, 1981). Neste sentido, o aparato é baseado na aversão natural de roedores a áreas iluminadas e no seu comportamento exploratório espontâneo em resposta a estressores leves, como a luz e o ambiente novo (BOURIN e HASCOËT, 2003; TAKAO e MIYAKAWA, 2006).

Costall e colaboradores modificaram o teste original e mediram atividade locomotora e exploração de pé (*rearing*) no compartimento claro e no compartimento escuro da, CBP (COSTALL 1987). Um perfil ansiolítico foi definido, baseado no efeito dos BDZs diazepam (DZ) e triazolam (TZ), como um aumento no *rearing* e na atividade locomotora no compartimento claro, com a concomitante diminuição destas medidas no compartimento escuro (COSTALL, 1987; LISTER, 1990). Dados da literatura sugerem que o tempo gasto na área clara e a atividade comportamental, como locomoção e *rearing*, podem ser medidas mais úteis do potencial ansiolítico de um componente do que as transições (HASCOËT, BOURIN e DHONNCHADHA, 2001), sendo estas consideradas um bom índice para atividade exploratória enquanto o tempo gasto em cada compartimento, considerado um reflexo da aversão proporcionada por eles (BOURIN e HASCOËT, 2003).

### ***1.3 Limitações dos Testes Comportamentais***

Apesar dos modelos comportamentais descritos acima apresentarem uma crescente popularidade, pesquisadores concordam que não há um modelo animal de ansiedade ideal (RAMOS, 2008), devido a algumas limitações significativas que eles apresentam (ANDREATTINI e BACELLAR, 2000). Primeiramente, os testes comportamentais existentes geralmente não conseguem reproduzir os diversos transtornos de ansiedade (KALUEFF, WHEATON e MURPHY, 2007). Assim, constitui um desafio para os cientistas, desenvolver testes animais que melhor reflitam os diferentes transtornos de ansiedade reconhecidos clinicamente (FILE, GONZALEZ e GALLANT, 1999). Como estes testes incondicionados (CA, LCE e CBP) evocam a exploração de

um ambiente novo, o efeito comportamental do tratamento farmacológico ou fisiológico, pode ser contaminado por seus efeitos intrínsecos na atividade locomotora (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997). Desta forma, alguns tratamentos farmacológicos podem causar mudanças na atividade locomotora por um mecanismo que não envolva mudanças na ansiedade (LISTER, 1990), como acontece com os BDZs, por exemplo, que apresentam para doses elevadas, relaxamento muscular e/ou sedação que confundem seus efeitos ansiolíticos em testes incondicionados (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997).

Por um certo tempo, o principal critério de validação de um modelo animal era a sua sensibilidade a compostos BDZs e muitos dos modelos existentes são pouco sensíveis a outros compostos não BDZs (HASCOËT, BOURIN e DHONNCHADHA, 2001), o que representa um problema para a detecção de novos agentes terapêuticos, sendo este um dos motivos pelos quais os testes foram desenvolvidos. Além disso, muitas das inconsistências encontradas nos resultados apresentados com estes testes comportamentais são resultantes da ênfase dada somente para a questão farmacológica e não para o perfil comportamental do animal. A adoção de uma avaliação etológica juntamente com a farmacológica é vantajosa, pois aumenta a validade de aparência e de construção do teste comportamental, facilita as conclusões sobre a especificidade do comportamento, permite comparações refinadas dentro e entre classes de drogas e reforça a sensibilidade a ação da droga (RODGERS *et al*, 1997; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Como estes modelos são baseados em comportamentos espontâneos ou etológicos, sofrem forte influência de mudanças ambientais e metodológicas, e de procedimentos de manipulação e experimentais não genéticos e não farmacológicos (LISTER, 1990; RODGERS, 1997; BOURIN e HASCOËT, 2003; KALUEFF, WHEATON e MURPHY, 2007). Assim, manipulações deliberadas ou acidentais de fatores não genéticos e não farmacológicos podem influenciar dramaticamente os resultados nos testes, alterando inclusive o efeito de drogas (HOGG, 1996). Diferenças presentes no grau de severidade de estressores externos (condições de alojamento dos animais, procedimentos de manipulação durante o teste) poderiam explicar as variações nos resultados apresentados por diferentes laboratórios, pois o estresse afeta a atividade locomotora e diferentes tipos de estressores podem afetar a resposta comportamental (SANCHEZ, 1997). Por

exemplo, diferenças marcantes na intensidade de luz entre os compartimentos branco e preto (700 lux/7 lux) da CBP reduzem o número de entradas de camundongos no compartimento branco, prejudicando o efeito ansiolítico do DZ e do CDZ (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997).

Alguns destes fatores podem contribuir para resultados falso-positivos, bem como para variações nos resultados experimentais entre diferentes laboratórios e até no mesmo laboratório (HASCOËT, BOURIN e DHONNCHADHA, 2001; BOURIN e HASCOËT, 2003; KALUEFF, WHEATON e MURPHY, 2007). Portanto, é preciso ter cautela antes da generalização de resultados experimentais e realizar uma análise mais abrangente dos testes comportamentais incondicionados, para obter informações mais detalhadas sobre os diferentes aspectos do comportamento animal, permitindo a interpretação mais confiável dos resultados (LIPKIND *et al*, 2004).

#### ***1.4 Fenômeno de “One Trial Tolerance”***

Estudos realizados com o LCE mostram que a experiência anterior no teste altera as respostas comportamentais e farmacológicas em exposições subseqüentes (FILE, 1990; LISTER, 1990; HOLMES *et al*, 2001). Segundo Rodgers, Lee e Shepherd (1992), o teste no LCE altera a natureza da reação relacionada à ansiedade de roedores no reteste. Além disso, a experiência prévia com ou sem droga no LCE reduz, ou mesmo suprime, a eficácia dos ansiolíticos BDZs a partir da segunda exposição ao aparato. A este fenômeno denomina-se *one trial tolerance* (OTT) (FILE, 1990; FILE e ZANGROSSI JR, 1993; HOLMES e RODGERS, 1998; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; ALBRECHET-SOUZA, BORELLI e BRANDÃO, 2008). Dados da literatura mostram OTT também com outros compostos, como barbitúricos, etanol, MK 801 entre outros (para revisão ver CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005) e com outros testes comportamentais como a CBP (HOLMES *et al*, 2001), a esQUIVA ao odor de gato (MCGREGOR e DIELENBERG, 1999) e o *four-plate* (HASCOËT, BOURIN e COUETOUX DU TERTRE, 1997). O fenômeno de OTT parece ocorrer independente do estado farmacológico no teste, do intervalo entre os testes e do material com o qual o labirinto é construído (FILE, 1990; RODGERS e SHEPHERD, 1993).

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar a ocorrência de OTT, entre as quais destacam-se a sensibilização do medo (RODGERS e SHEPHERD, 1993), a mudança qualitativa no estado

emocional (FILE e ZANGROSSI JR, 1993; FILE *et al.*, 1993; HOLMES e RODGERS, 1998; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2000), a habituação locomotora (DAWSON *et al.*, 1994), o estado alterado do sítio de ligação BDZs (FILE *et al.*, 1992) e a redução do conflito na reexposição (RODGERS e SHEPHERD, 1993). A sensibilização do medo se refere a um aumento da esquiva aos braços abertos, ou uma redução da atividade nos braços abertos, durante o reteste, refletindo uma mudança quantitativa e/ou qualitativa do comportamento no LCE (VARGAS, DA CUNHA e ANDREATINI, 2006). De fato, a análise minuto a minuto do perfil comportamental no LCE mostra uma progressiva esquiva dos braços abertos a partir do segundo minuto de teste, que permanece durante todo o reteste, bem como, em exposições subseqüentes (HOLMES e RODGERS, 1998; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002).

Segundo o estudo realizado por Rodgers *et al.* (1995), no primeiro minuto de teste no LCE os ratos realizam altos níveis de avaliação de risco, objetivando obter informações do ambiente. No entanto, a partir do segundo minuto, demonstram uma preferência pelos braços fechados acompanhada de alta atividade, como *rearing*, *grooming* e retornos aos braços fechados (*returns*). Este perfil sugere uma aprendizagem espacial rápida, seguida de uma esquiva das áreas potencialmente perigosas do labirinto (RODGERS *et al.*, 1995). Postula-se que a mudança qualitativa no estado emocional se trata de uma mudança na resposta aversiva, ou seja, de uma resposta de medo incondicionada no teste para um medo fóbico (ou uma resposta de medo aprendida, ou ainda, esquiva aprendida) no reteste (FILE e ZANGROSSI JR, 1993; BERTOGLIO e CAROBREZ 2000; VARGAS, DA CUNHA e ANDREATINI, 2006). Tal medo fóbico seria resultante do espaço aberto e da altura presentes nos braços abertos do LCE (FILE e ZANGROSSI JR, 1993). Desta forma, a experiência prévia no LCE, ao invés de induzir a tolerância ao efeito ansiolítico dos BDZs, induz uma fobia (FILE e ZANGROSSI JR, 1993; RODGERS e SHEPHERD, 1993), contra a qual os BDZs são relativamente ineficazes (MARKS, 1987). File *et al.* (1990) sugeriram que a experiência nos braços abertos é o fator crucial para a esquiva dos braços abertos, enquanto Holmes e Rodgers (1999) e Roy *et al.* (2009) enfatizam a experiência prévia nos braços fechados. Já Bertoglio e Carobrez (2000) sugeriram que a existência de dois ambientes com diferentes níveis de aversão (braços abertos e braços fechados) é o fator chave para o processo de esquiva aprendida no teste.

A hipótese de habituação propõe que a ineficácia dos BDZs é resultante de uma habituação da atividade locomotora entre as sessões de teste (DAWSON *et al*, 1994). Entretanto, dados da literatura mostram a ocorrência de OTT sem uma habituação da atividade locomotora, que pode ser demonstrada através de uma manutenção ou aumento das entradas nos braços fechados do LCE entre as sessões de teste (RODGERS *et al*, 1995). Outra hipótese sugere que a experiência prévia no aparato pode induzir uma alteração funcional no sítio de ligação do complexo receptor GABA/BDZ, tornando-o insensível a modulação alostérica de drogas (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003). Finalmente, o que leva o animal a explorar o ambiente novo é a existência de um conflito aproximação/esquiva, ou seja, aproximar pela motivação em explorar e esquivar (ou evitar) pelo medo do novo (OHL, 2003). A experiência prévia no LCE reduz a motivação em explorar os braços abertos e, mesmo após a administração de uma droga ansiolítica, não há um aumento na motivação em explorar o familiar braço aberto, não apresentando, portanto, efeito ansiolítico no reteste (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). A presença do conflito aproximação/esquiva no teste permite que o aparato tenha alta sensibilidade aos efeitos ansiolíticos dos BDZs, enquanto no reteste, o conhecimento do perigo inerente aos braços abertos faz com que os animais deixem de explorá-los (ALBRECHET-SOUZA *et al*, 2007).

Roedores continuam a exibir uma resposta comportamental de exploração dos braços abertos no reteste, ou seja, ausência de OTT, nos seguintes casos: 1) administração de uma dose amnésica de CDZ (75 mg/kg) (FILE *et al*, 1990), escopolamina (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2004) ou propranolol antes do teste (STERN, CAROBREZ e BERTOGLIO, 2008); 2) duração da sessão de teste/ reteste aumentada para 10 min (FILE *et al*, 1993); 3) duração da sessão de teste reduzida para um 1 minuto (DAL-COL *et al*, 2003); 4) introdução de um novo conflito motivacional (estímulos aversivos associados aos braços fechados: luz e vento quente) (PEREIRA *et al*, 1999); 5) inativação temporária com lidocaína da amígdala basolateral após o teste (FILE, GONZALEZ e CALLANT, 1998) ou do hipotálamo dorsomedial, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPd) e hipocampo dorsal antes do reteste (FILE, GONZALEZ e CALLANT, 1999; BERTOGLIO *et al*, 2005; BERTOGLIO, JOCA e GUIMARÃES, 2006). Estes últimos trabalhos são interpretados como um prejuízo na consolidação (amígdala) e recuperação (hipotálamo, hipocampo dorsal e SCPd) da informação

adquirida durante o teste (VARGAS, DA CUNHA e ANDREATINI, 2006). Por outro lado, a administração sistêmica de anfetamina e PTZ pós-teste aumenta a retenção da memória e facilita o desenvolvimento de OTT (VARGAS, DA CUNHA e ANDREATINI, 2006). O efeito da administração de doses amnésicas de CDZ, escopolamina e propranolol, juntamente com a inativação temporária das estruturas encefálicas citadas acima e a administração sistêmica de anfetamina e PTZ, sugerem que a aprendizagem e a memória tem um papel importante no desenvolvimento de OTT. Esta hipótese não exclui as outras citadas acima, mas complementa algumas delas.

### ***1.5 Propostas para Minimizar as Limitações dos Testes Comportamentais***

Alguns pesquisadores concordam que nenhum dos testes comportamentais fornece uma medida pura e incontestável da reatividade emocional e que cada teste, individualmente, avalia apenas uma fração do perfil emocional dos animais (RAMOS, 2008; RAMOS et al, 2008). Neste sentido, baterias de testes comportamentais têm sido amplamente utilizadas com o intuito de melhor se compreender o perfil emocional dos animais experimentais (RAMOS *et al*, 1997). No entanto, dados da literatura sugerem que os testes comportamentais são sensíveis aos efeitos da experiência no teste anterior (PAYLOR *et al*, 2006). Adicionalmente, alguns pesquisadores fazem uso de determinadas estratégias, como: (1) a análise de mais parâmetros etológicos, como os comportamentos de avaliação de risco (*stretched-attend posture, closed-arm returns, peeping out, flat-back approach*, entre outros) (HOLMES e RODGERS; 1998; SILVA e BRANDÃO, 1999; HOLMES *et al*, 2001; ALBRECHET-SOUZA *et al*, 2007; ALBRECHET-SOUZA, BORELLI e BRANDÃO, 2008) que aumentam a utilidade e a sensibilidade do modelo (SILVA e BRANDÃO, 1999); (2) o monitoramento da concentração de corticosterona plasmática, que aparece aumentada no organismo do animal após a exposição a um estímulo estressante (PELLOW *et al*, 1985; ALBRECHET-SOUZA *et al*, 2007) e (3) a proposição de novos modelos comportamentais e/ou reestruturação dos modelos existentes. Como exemplo podemos citar: o Labirinto em T Elevado (ZANGROSSI JR e GRAEFF, 1997), *plus-maze discriminative avoidance task* (SILVA e FRUSSA-FILHO, 2000), *Suok test* (KALUEFF *et al*, 2008) e versões

modificadas do CA (POGORELOV, LANTHORN e SAVELIEVA, 2007; LAMPREIA *et al.*, 2008) e do LCE (ROY *et al.*, 2009).

Neste sentido, Ramos *et al.* (2008) propuseram a combinação física dos três testes comportamentais mais utilizados na avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade (CA, LCE e CBP), denominando-o de “teste triplo”. Este novo paradigma não é a simples soma de testes individuais, pois, durante o período no qual o animal é testado, ele tem livre acesso a cada um dos três compartimentos, que são naquele momento inéditos a ele (RAMOS, 2008). O teste triplo se propõe a aumentar nossa compreensão a respeito destes testes populares e melhorar a interpretação dos dados comportamentais observados nos mesmos. No presente trabalho apresentamos os experimentos farmacológicos realizados no teste triplo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da ampla utilização do CA, do LCE e da CBP tanto para o estudo dos comportamentos relacionados à ansiedade em animais quanto para triagem de potenciais agentes terapêuticos, a compreensão das respostas comportamentais apresentadas pelos roedores nestes testes não é satisfatória, persistindo muitas dúvidas sobre o que estes testes medem exatamente. Para solucionar estas questões e obter uma avaliação mais completa da resposta emocional dos animais, muitos pesquisadores utilizam baterias de testes. Porém, estas podem ocasionar alguns problemas, pois o mesmo animal não pode ser testado ao mesmo tempo em diferentes testes comportamentais. Por outro lado, a experiência no teste anterior pode influenciar a resposta comportamental no teste seguinte e o estado emocional do animal pode variar ao longo do tempo.

Para tentar resolver estes problemas, foi proposta a integração física de três testes comportamentais de ansiedade (CA, LCE e CBP), o qual denominamos teste triplo. Experimentos pilotos realizados em nosso laboratório com o teste triplo mostraram que: (1) os ratos colocados no centro do CA no início da sessão de teste apresentaram altos níveis de exploração geral em todo o teste triplo; (2) um período de teste de 15 min é o suficiente para que os ratos explorem todos os três aparatos do teste triplo; (3) as linhagens isogênicas LEW e SHR, conhecidas por apresentarem altos e baixos perfis emocionais relacionados à ansiedade no CA, no LCE e na CBP, também diferem de maneira consistente em todas as medidas relacionadas à ansiedade no teste triplo e (4) uma análise de componentes principais sugere que os três testes usados em combinação avaliam as mesmas dimensões comportamentais básicas, como aquelas que são avaliadas pelos testes individualmente. Baseados nestes dados, este trabalho foi realizado para verificar os efeitos de três drogas moduladoras de ansiedade (midazolam, clordiazepóxido e pentilenotetrazol) no teste triplo, bem como a possibilidade de se usar o novo teste de forma repetida.

As hipóteses iniciais deste trabalho foram: 1) os diferentes testes comportamentais aqui utilizados apresentam significados psicológicos diferentes; 2) a combinação física de três testes (CA, LCE e CBP) permite avaliar diferentes aspectos da emocionalidade simultaneamente, evitando os efeitos da experiência prévia, das manipulações e intervalos entre os testes; 3) o novo modelo integrado, por ser mais complexo, é

capaz de responder ao tratamento agudo e crônico de compostos ansiolíticos e ansiogênicos.

### **3. OBJETIVOS**

#### ***3.1 Objetivo Geral***

Validar farmacologicamente um novo modelo comportamental integrado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade/emocionalidade em ratos.

#### ***3.2 Objetivos Específicos***

- Verificar os efeitos do tratamento agudo com os benzodiazepínicos midazolam e clordiazepóxido;
- Verificar os efeitos do tratamento agudo com pentilenotetrazol;
- Verificar os efeitos do tratamento com clordiazepóxido em repetidas exposições ao teste triplo;
- Compreender melhor o significado de cada um dos testes comportamentais que compõem o teste triplo através de testes farmacológicos;
- Comparar a eficiência do teste triplo na investigação do efeito de drogas que modulam à ansiedade com os testes individuais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

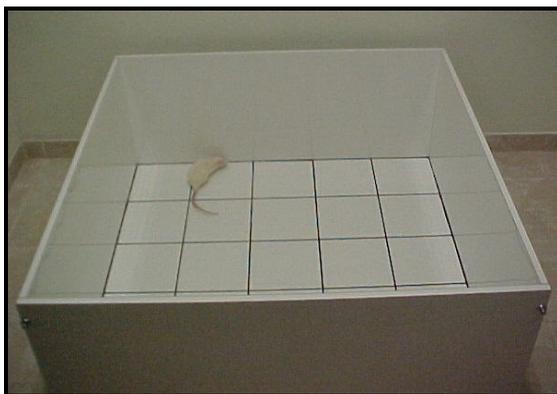
### 4.1 Animais

Foram utilizados 317 ratos Wistar machos, entre 9 e 11 semanas de idade. Os animais foram criados em nosso laboratório, desmamados e separados por sexo com três a quatro semanas de idade, e mantidos em gaiolas coletivas de polipropileno (5-6 animais por gaiola), com água e comida disponíveis *ad libitum*, sob um ciclo claro/ escuro de 12: 12 h (luzes acesas às 07:00h) e temperatura mantida a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os experimentos 1 a 3 e 6 a 8 foram realizados entre 13:00h e 18:00h, e os experimentos 4 e 5 entre 08:30h e 11:00h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do Comitê de Ética em Experimentação Animal local (CEUA/UFSC, Protocolo N° PP00191).

### 4.2 Aparatos Comportamentais

#### 4.2.1 Campo Aberto (CA)

O aparato consiste em uma arena de madeira coberta com fórmica impermeável possuindo uma área de 100 x 100 cm, com o chão branco, dividido em 25 quadrados de 20 x 20 cm (linhas divisórias pretas), 9 quadrados formam a área central e 16 a área periférica; as paredes, também brancas, têm 40 cm de altura. A luminosidade utilizada no aparato durante os experimentos foi de 10 lux.



**Figura 1.** Campo Aberto utilizado nos experimentos.

#### ***4.2.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)***

O aparato é feito de madeira coberta com uma camada de fórmica preta, apresentando quatro braços, sendo dois fechados e dois abertos, distantes 52 cm do chão. Os dois braços fechados são opostos, medindo 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, com paredes de 42 cm de altura, formando uma cruz com os braços abertos, os quais também medem 50 cm de comprimento por 10 cm de largura, sendo margeados por um anteparo de 0,5 cm de altura e 0,1 cm de espessura (para evitar a queda dos animais do aparato). Na interseção entre os braços fechados e abertos existe uma plataforma central medindo 13,5 x 10 cm que oferece acesso a cada um dos quatro braços. A luminosidade utilizada no aparato durante os experimentos foi de 15 lux (medido a partir dos braços abertos do LCE).

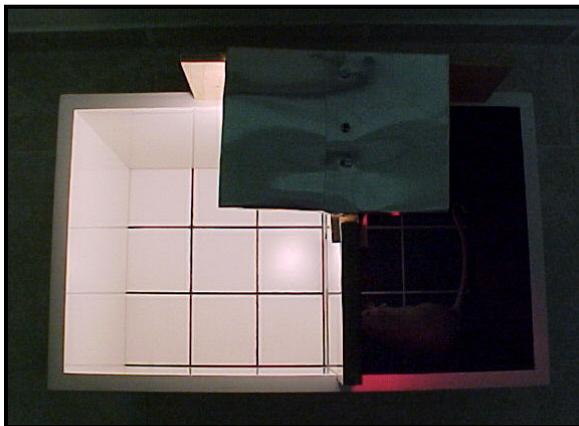


**Figura 2.** Labirinto em Cruz Elevado utilizado nos experimentos.

#### ***4.2.3 Caixa Branca e Preta (CBP)***

O aparato é feito de madeira coberta com fórmica e apresenta dois compartimentos: um branco fortemente iluminado (750 lux), medindo 27x27x27 cm, cujo chão é dividido em 9 quadrados (9x9 cm); e outro

preto iluminado com luz vermelha (20 lux), medindo 27x18x27 cm, cujo chão é dividido em 6 quadrados (9x9 cm). Os dois compartimentos são conectados por uma pequena abertura de 7x7 cm. Ambas as lâmpadas de 40 W são localizadas 30 cm acima do piso do aparato.

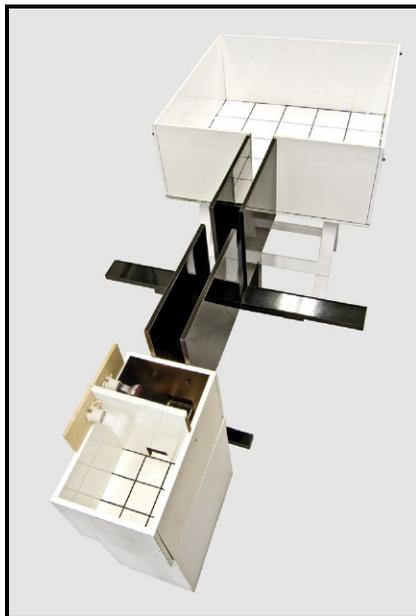


**Figura 3.** Caixa Branca/Preta utilizada nos experimentos.

#### ***4.2.4 Teste Triplo***

O Teste Triplo consiste na junção dos três aparatos anteriormente descritos, que se encontram conectados por aberturas localizadas nos braços fechados do LCE, no compartimento preto da CBP e uma abertura central em uma das paredes do CA. O LCE encontra-se no centro do teste triplo, servindo como conexão entre o CA e a CBP. Assim, no teste triplo temos o CA, onde uma de suas paredes encontra-se conectada a um dos braços fechados do LCE por uma abertura central (10 cm de largura por 40 cm de altura) que permite livre acesso a todo o labirinto e conseqüentemente à CBP. Na extremidade do outro braço fechado do LCE há uma abertura (10 x 7 cm) conectando-o a CBP. Essa abertura encontra-se no centro de uma das paredes do compartimento preto da caixa, e, oposta a essa, existe outra pequena abertura (7x7 cm) ligando os dois compartimentos da CBP. O teste triplo está disposto a 52 cm do chão para que as características aversivas dos braços abertos do LCE sejam mantidas. Os experimentos foram realizados em ambiente

com baixa luminosidade, com o CA apresentando 10 lux, o LCE 15 lux e a CBP 20 lux no compartimento preto e 750 lux no compartimento branco.



**Figura 4.** Teste Triplo utilizado nos experimentos (Fonte: RAMOS, 2008).

### 4.3 Drogas

O clordiazepóxido (CDZ) (Centaur, India) foi suspenso em metilcelulose 0,5% (MC 0,5%), como descrito previamente (VENDRUSCOLO *et al*, 2003), e administrado intraperitonealmente (i.p.) (2 ml/kg) 30 min antes do teste, nas doses de 0,5, 5 e 10 mg/kg. O grupo controle recebeu um volume similar de MC 0,5%. O volume e o tempo de injeção foram escolhidos com base em dois estudos anteriores realizados para verificar o efeito do CDZ no LCE e na CBP em ratos (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997; PELLOW *et al*, 1985). As doses foram escolhidas com base na eficácia apresentada em trabalhos anteriores, 5 mg/kg no CA e no LCE (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997; PELLOW *et al*, 1985; VENDRUSCOLO *et al*, 2003), 10 mg/kg na CBP (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997) e 0,5 mg/kg (CRAWLEY, 1981). O midazolam (MDZ) (Cristalia, Brasil) foi

dissolvido em salina (NaCl 0,9%) e administrado i.p. (1ml/kg) 30 min antes do teste, nas doses de 0,1875, 0,375 e 0,750 mg/kg. O grupo controle recebeu um volume similar de salina. O volume, a dose e o tempo de tratamento foram baseados em um estudo prévio mostrando o efeito ansiolítico desta droga em ratos no LCE (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002). Devido ao menor número de grupos de tratamento disponíveis neste experimento, o intervalo da dose foi ligeiramente mais estreito do que foi usado no artigo citado (ou seja, de 0,187 a 0,75 mg/kg em vez de 0,125 a 1,0 mg/kg). O pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma Aldrich, Alemanha) foi dissolvido em salina e administrado i.p. (2 ml/kg) nas doses de 10 e 20 mg/kg, 5 min antes do teste, como previamente descrito em três estudos com ratos (PELLOW *et al*, 1985; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RAMOS *et al*, 1997), o grupo controle recebeu um volume similar de salina.

#### ***4.4 Protocolos Experimentais***

##### ***4.4.1 Experimento 1: Efeito do MDZ no Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do MDZ no teste triplo. Assim, os animais receberam MDZ a 0,1875 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,750 mg/kg ou salina (NaCl 0,9%) e retornaram para sua gaiola-moradia. Após 30 min, cada animal foi posicionado no centro do CA, onde poderiam explorar livremente o três aparatos do teste triplo (CA, LCE e CBP) por 15 min. Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: locomoção central e periférica (com as quatro patas) e o tempo no centro do CA, entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados do LCE, locomoção e tempo gasto no compartimento preto e branco e o número de transições da CBP. No final de cada sessão de teste, o aparato foi limpo com etanol 10 % e seco com papel toalha. Os comportamentos foram registrados por três microcâmeras localizadas acima do aparato e monitorados por um experimentador treinado através de um microcomputador em uma sala adjacente. O experimentador não foi informado sobre o tratamento aplicado a cada animal.

#### ***4.4.2 Experimento 2: Efeito do CDZ no Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do CDZ no teste triplo. Assim, os animais receberam CDZ a 0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ou MC 0,5% e retornaram para sua gaiola-moradia. Após 30 min, cada animal foi posicionado no centro do CA, onde poderiam explorar livremente o três aparatos do teste triplo por 15 min. Os parâmetros comportamentais avaliados, a limpeza do aparato e a gravação foi realizada de acordo com o experimento 1.

#### ***4.4.3 Experimento 3: Efeito do PTZ no Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do PTZ no teste triplo. Assim, os animais receberam PTZ a 10 mg/kg, 20 mg/kg ou salina (NaCl 0,9%) e retornaram para sua gaiola-moradia. Após 5 min, cada animal foi posicionado no centro do CA, onde poderiam explorar livremente o três aparatos do teste triplo por 15 min. Os parâmetros comportamentais avaliados, a limpeza do aparato e a gravação foi realizada de acordo com o experimento 1.

#### ***4.4.4 Experimento 4: Efeito do CDZ no CA***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do CDZ no CA isoladamente, já que esta droga não apresentou o efeito ansiolítico esperado no Teste Triplo. Assim, os animais receberam CDZ 0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ou MC 0,5% e retornaram para sua gaiola-moradia. Após 30 min, cada animal foi posicionado no centro do CA, onde foram registrados locomoção central e periférica (com as quatro patas) e o tempo gasto no centro do CA durante 5 min. No final de cada sessão de teste, o aparato foi limpo com etanol 10 % e seco com papel toalha. Os comportamentos foram gravados por uma microcâmera localizada acima do aparato e monitorados por um experimentador treinado através de um microcomputador em uma sala adjacente. O experimentador não foi informado sobre o tratamento aplicado a cada animal.

#### ***4.4.5 Experimento 5: Efeito do CDZ na CBP***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do CDZ na CBP isoladamente, já que esta droga não apresentou o efeito ansiolítico esperado no Teste Triplo. Assim, os animais receberam CDZ a 0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg ou MC 0,5%. Após 30 min, cada animal foi posicionado no compartimento branco da CBP, com a cabeça voltada para a porta de acesso ao compartimento preto, onde foram testados por 5 min. Foram registrados a locomoção e o tempo gasto nos compartimentos preto e branco e o número de transições. A limpeza do aparato e gravação foi realizada de acordo com o experimento 4.

#### ***4.4.6 Experimento 6: Efeito do Reteste nos Efeitos do CDZ no Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do CDZ no teste triplo em dois dias repetidos. No dia 1, os animais receberam CDZ a 10 mg/kg ou MC 0,5% e retornaram para sua gaiola-moradia. Esta dose de CDZ foi escolhida com base no experimento 2, onde apresentou efeito ansiolítico na porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE. Após 30 min, cada animal foi avaliado no teste triplo por 15 min e ao término do período de teste, os animais voltaram para gaiola-moradia. No dia 2, 24 h depois, os animais tratados com CDZ 10 mg/kg ou MC 0,5% receberam novamente os mesmos respectivos tratamentos e, após 30 min, foram submetidos ao teste triplo. Os parâmetros comportamentais avaliados, a limpeza do aparato e a gravação foi realizada de acordo com o experimento 1.

#### ***4.4.7 Experimento 7: Efeito do CDZ em 4 Dias de Exposição Repetida ao Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do CDZ nos animais expostos por quatro dias seguidos no teste triplo, sendo também avaliado o efeito da exposição prévia sem tratamento farmacológico nos efeitos do CDZ no dia seguinte, combinação está não avaliada no experimento 6. No dia 1, todos os animais receberam MC 0,5% e retornaram para sua gaiola-moradia. Após 30 min, cada animal foi avaliado no teste triplo por 15 min. Ao término do período de teste os animais voltaram para gaiola-moradia. Nos dias 2, 3 e 4, sempre 24 h

depois do teste anterior, os animais que anteriormente receberam MC 0,5%, foram divididos em dois grupos. O grupo controle recebeu MC 0,5%, e o grupo tratado recebeu CDZ 10 mg/kg, e após 30 min foram avaliados no teste triplo. Os parâmetros comportamentais avaliados, a limpeza do aparato e a gravação foi realizada de acordo com o experimento 1.

#### ***4.4.8 Experimento 8: Efeito Crônico do CDZ no Teste Triplo***

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito crônico do CDZ no teste triplo durante 20 dias. Todos os dias os animais receberam CDZ 10 mg/kg ou MC 0,5%, e após 30 min, cada animal foi avaliado no teste triplo. Os parâmetros comportamentais avaliados, a limpeza do aparato e a gravação foi realizada de acordo com o experimento 1.

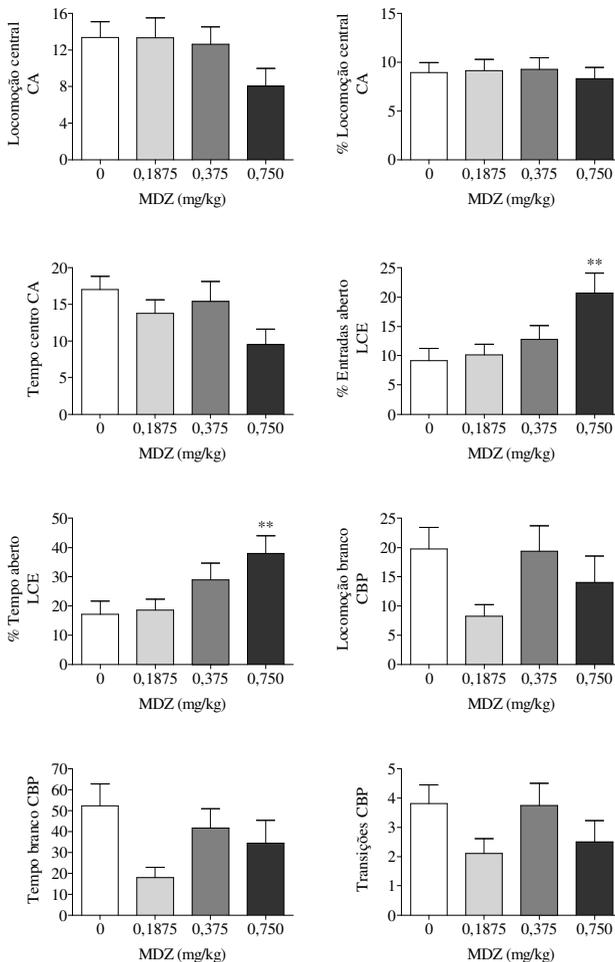
#### ***4.5 Análise Estatística***

No experimento 1, 2, 3, 4 e 5 foi utilizado ANOVA de uma via para o fator tratamento, seguido do teste *post-hoc* de Duncan. Nos experimentos 6, 7 e 8 foi utilizado ANOVA de medidas repetidas para os fatores tratamento e repetição, seguido do teste *post-hoc* de Duncan. No experimento 7, de quatro dias de exposição repetida ao Teste Triplo, foi realizada análise estatística somente dos dias 2, 3 e 4 porque os animais não receberam tratamento com CDZ no dia 1. A média de tempo total gasto pelos animais em cada aparato do teste triplo foi analisada a partir dos dados obtidos no experimento 2 por ANOVA de uma via (efeito de CDZ a 0, 0,5, 5 e 10 mg/kg). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica® 8.0.

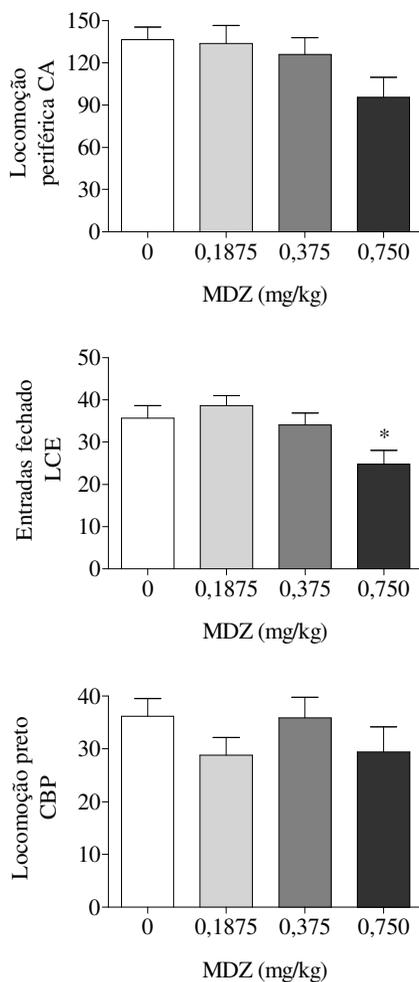
## 5. RESULTADOS

### *5.1 Experimento 1: Efeito do MDZ no Teste Triplo*

Os resultados do experimento 1 são ilustrados nas Figuras 5 e 6. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na % de entradas ( $F_{(3,62)}=4,34$ ;  $p<0,01$ ) e na % de tempo gasto ( $F_{(3,62)}=3,73$ ;  $p<0,05$ ) nos braços abertos e no número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3,62)}=4,46$ ;  $p<0,01$ ) do LCE. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que somente a maior dose de MDZ de 0,75 mg/kg aumentou a preferência pelos braços abertos ( $p<0,01$ ) e diminuiu as entradas nos braços fechados ( $p<0,05$ ) do LCE. A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, nos parâmetros comportamentais avaliados no CA e na CBP.



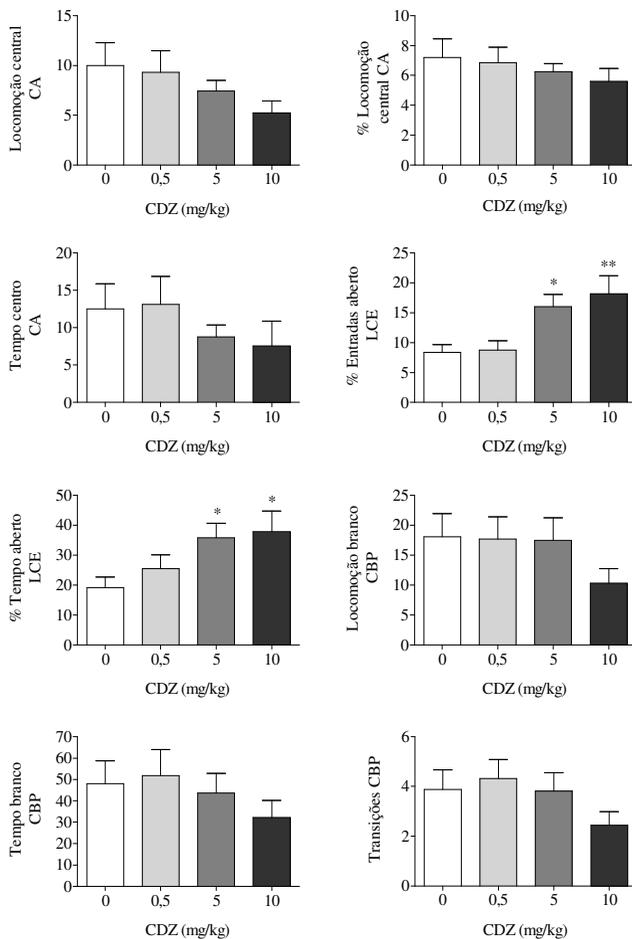
**Figura 5.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de midazolam (MDZ) 0,187, 0,375 ou 0,75 mg/kg) no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % de locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE, locomoção, tempo no compartimento branco e transições da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 16-18). (\*\*) Representa diferença significativa entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,01$ ).



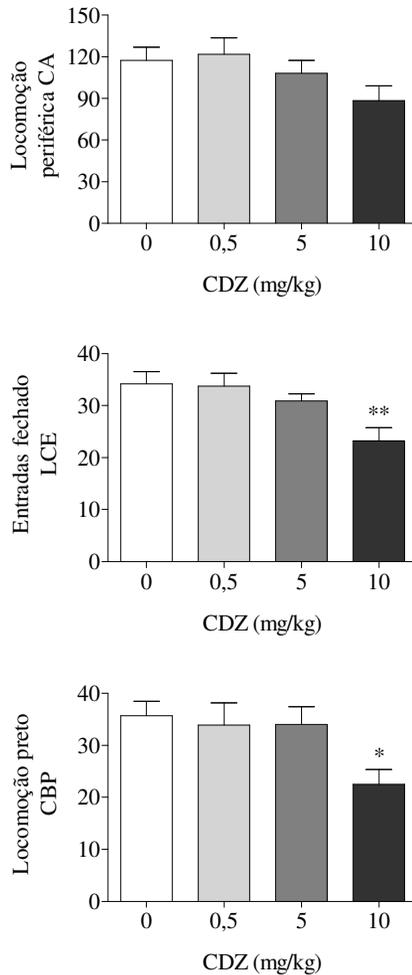
**Figura 6.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de midazolam (MDZ 0,187, 0,375 ou 0,75 mg/kg) no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica no CA, entradas no fechado do LCE e locomoção no preto da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 16-18). (\*) Representa diferença significativa entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,05$ ).

## 5.2 Experimento 2: Efeito do CDZ no Teste Triplo

Os resultados do experimento 2 são ilustrados nas Figuras 7 e 8. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na % de entradas ( $F_{(3,60)}=5,98$ ;  $p<0,01$ ) e na % de tempo gasto ( $F_{(3,60)}=3,03$ ;  $p<0,05$ ) nos braços abertos e nas entradas nos braços fechados ( $F_{(3,60)}=5,13$ ;  $p<0,01$ ) do LCE. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que as doses de CDZ de 5 mg/kg e 10 mg/kg ( $p<0,05$ ) aumentaram a preferência pelos braços abertos, e a dose de 10 mg/kg diminuiu as entradas nos braços fechados ( $p<0,01$ ) do LCE. Na CBP a ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o fator tratamento na locomoção no compartimento preto ( $F_{(3,60)}=3,16$ ;  $p<0,05$ ), onde o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os animais tratados com a dose de CDZ de 10 mg/kg diminuíram a locomoção no compartimento preto da CBP ( $p<0,05$ ) em relação aos animais controle. A ANOVA não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, nos parâmetros comportamentais avaliados no CA.



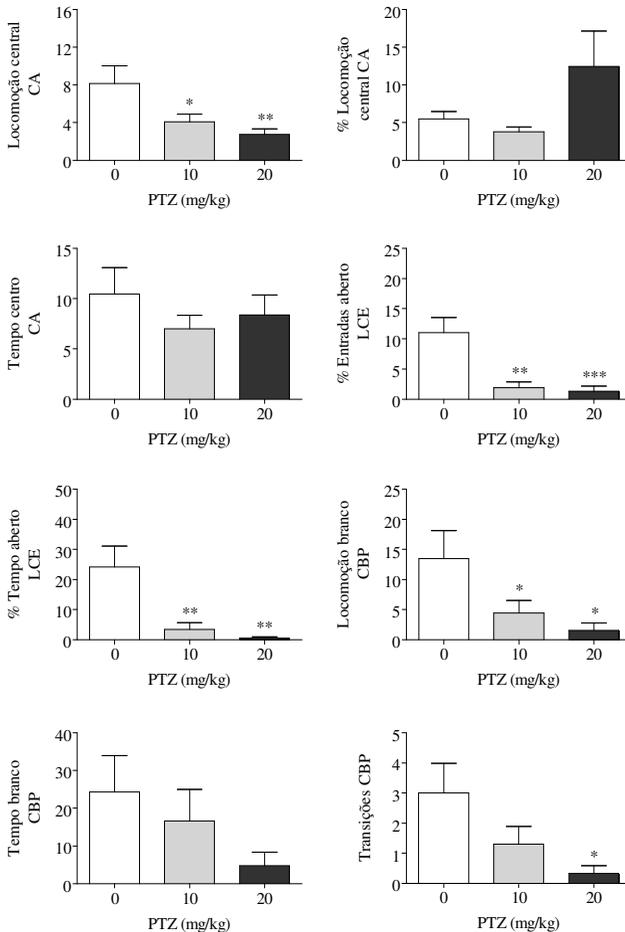
**Figura 7.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg) no teste tripla. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE, locomoção, tempo no branco e transições da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 16). (\*), (\*\*) Representam diferenças significativas entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente).



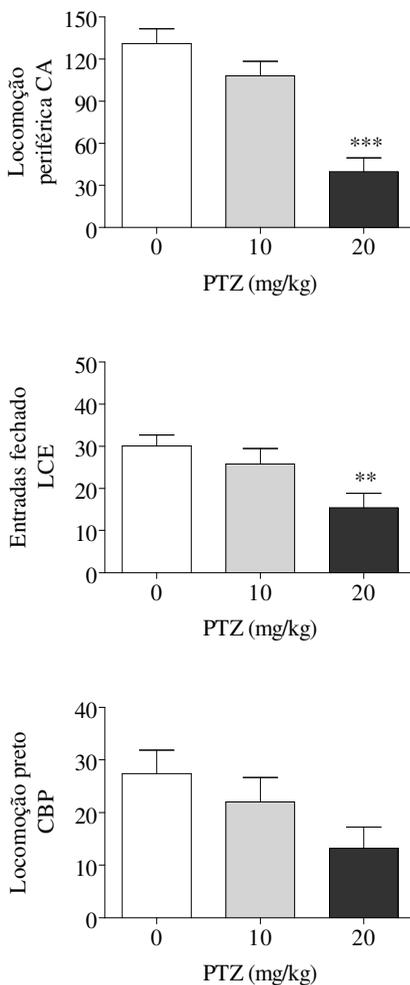
**Figura 8.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 e 10 mg/kg) no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica no CA, entradas no fechado do LCE, locomoção no preto da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle ( $n = 16$ ). (\*), (\*\*). Representam diferenças significativas entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente).

### 5.3 Experimento 3: Efeito do PTZ no Teste Triplo

Os resultados do experimento 3 são ilustrados nas Figuras 9 e 10. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator tratamento na locomoção central ( $F_{(2,35)}=5,11$ ;  $p<0,05$ ) e periférica ( $F_{(2,35)}=20,83$ ;  $p<0,001$ ) no CA. O teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição na locomoção periférica no CA dos animais tratados com PTZ 20 mg/kg ( $p<0,001$ ) em relação aos animais controle, e uma diminuição na locomoção central no CA dos animais tratados com PTZ 10 mg/kg ( $p<0,05$ ) e 20 mg/kg ( $p<0,01$ ) em relação aos animais controle. No LCE, a ANOVA de uma via revelou efeito significativo para o fator tratamento nas % entradas ( $F_{(2,35)}=9,89$ ;  $p<0,001$ ) e % tempo gasto ( $F_{(2,35)}=7,82$ ;  $p<0,01$ ) nos braços abertos, onde o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição nas % de entradas nos braços abertos dos animais tratados com PTZ a 10 mg/kg ( $p<0,01$ ) e 20 mg/kg ( $p<0,001$ ). Uma diminuição na % tempo gasto nos braços abertos dos animais tratados com PTZ 10 mg/kg ( $p<0,01$ ) e 20 mg/kg ( $p<0,01$ ) também foi observada. Nas entradas nos braços fechados do LCE, a ANOVA também revelou um efeito do tratamento ( $F_{(2,35)}=6,91$ ;  $p<0,01$ ), onde o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição das entradas nos braços fechados dos animais tratados com PTZ 20 mg/kg ( $p<0,01$ ). Na CBP a ANOVA revelou efeito significativo para o fator tratamento na locomoção no compartimento branco ( $F_{(2,35)}=4,02$ ;  $p<0,05$ ) e nas transições entre os compartimentos ( $F_{(2,35)}=3,76$ ;  $p<0,05$ ), onde o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição nestes parâmetros dos animais tratados com PTZ 20 mg/kg ( $p<0,05$ ) em relação aos animais controle.



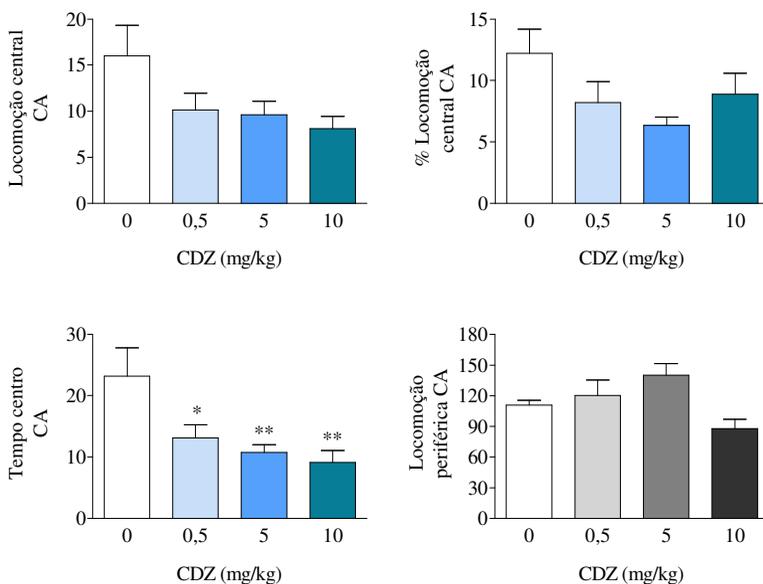
**Figura 9.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de pentilenotetrazol (PTZ 10 ou 20 mg/kg) no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE, locomoção, tempo no branco e transições da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 11-13). (\*), (\*\*) e (\*\*\*) Representam diferenças significativas entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).



**Figura 10.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com salina (NaCl 0,9%) ou diferentes doses de pentilenotetrazol (PTZ 10 ou 20 mg/kg) no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica, entradas no fechado e locomoção no preto da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 11-13). (\*\*) e (\*\*\*) Representam diferenças significativas entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

#### **5.4 Experimento 4: Efeito do CDZ no CA**

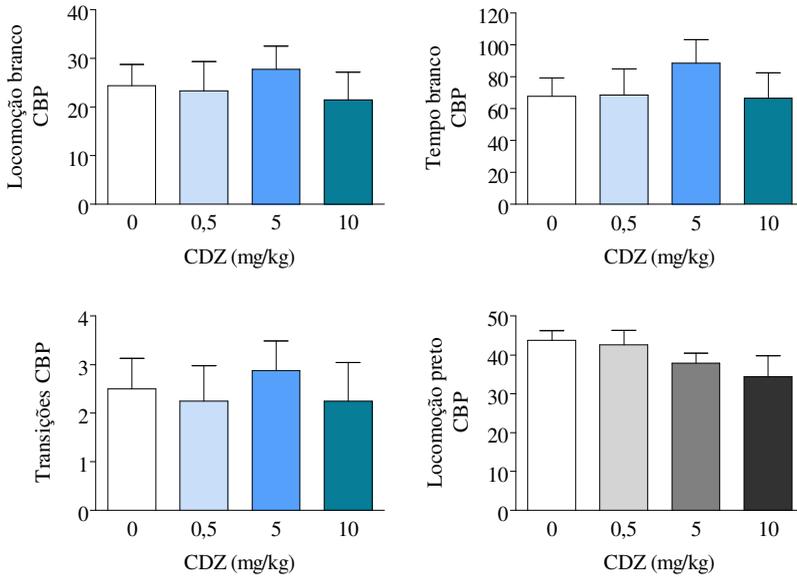
Os resultados do experimento 4, que buscou avaliar se o CA é consistentemente sensível as BDZs nas nossas condições experimentais, são ilustrados na Figura 11. A ANOVA de uma via não apresentou efeitos significativos entres os grupos tratados em relação ao grupo controle na locomoção central e periférica no CA. A ANOVA revelou um efeito significativo para o fator tratamento no tempo gasto no centro do CA ( $F_{(3,28)}=4,95$ ;  $p<0,01$ ), enquanto o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição do tempo gasto no centro do CA de todos os grupos tratados em relação ao grupo controle.



**Figura 11.** Comportamentos relacionados à ansiedade (azul) e a locomoção (escala de cinza) de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 ou 10 mg/kg) no CA. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 5 min: locomoção e % locomoção central, tempo no centro e locomoção periférica no CA. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 8). (\*), (\*\*) Representam diferenças significativas entre os grupos tratados e seu respectivo grupo controle (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).

### 5.5 Experimento 5: Efeito do CDZ na CBP

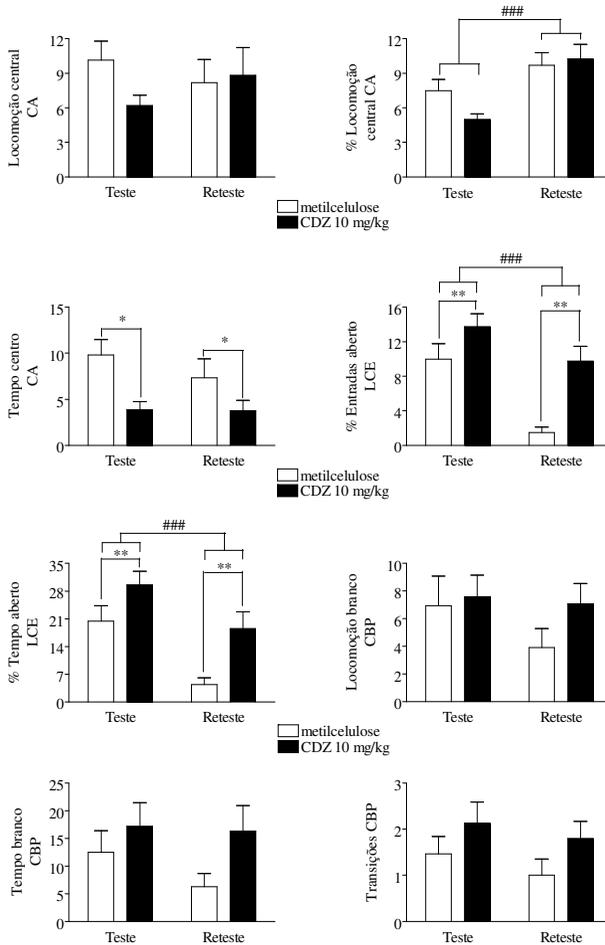
A ANOVA não apresentou efeitos significativos entre os grupos experimentais, para nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados na CBP (Figura 12).



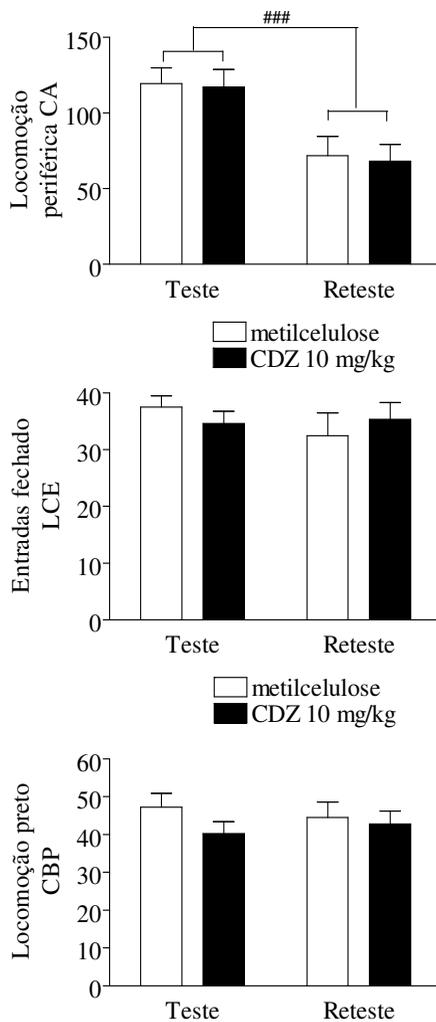
**Figura 12.** Comportamentos relacionados à ansiedade (azul) e a locomoção (escala de cinza) de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou diferentes doses de clordiazepóxido (CDZ 0,5, 5 ou 10 mg/kg) na CBP. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 5 min: locomoção no branco e no preto, tempo no branco e transições na CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle ( $n = 8$ ).

### ***5.6 Experimento 6: Efeito do Reteste nos Efeitos do CDZ no Teste Triplo***

Os resultados do experimento 6 estão ilustrados nas Figuras 13 e 14. A ANOVA não apresentou nenhuma interação entre o dia e o tratamento nos parâmetros comportamentais avaliados no teste triplo. No CA, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo geral para o fator repetição com uma diminuição na locomoção periférica no CA no reteste em relação ao teste ( $F_{(1,28)}=25,87$ ;  $p<0,001$ ), e um aumento na % de locomoção central no CA no reteste em relação ao teste ( $F_{(1,28)}=20,29$ ;  $p<0,001$ ). Um efeito significativo para o fator tratamento também foi observado, sendo que os animais tratados com CDZ apresentaram uma redução no tempo gasto no centro do CA no teste e no reteste ( $F_{(1,28)}=7,63$ ;  $p<0,05$ ). A ANOVA não apresentou efeito significativo na locomoção central no CA. No LCE, um efeito significativo geral para o fator repetição foi observado, com diminuição na % de entradas ( $F_{(1,28)}=27,93$ ;  $p<0,001$ ) e na % de tempo ( $F_{(1,28)}=18,89$ ;  $p<0,001$ ) nos braços abertos no reteste em relação ao teste. Um efeito significativo para o fator tratamento também foi observado, sendo que os animais tratados com CDZ apresentaram maior % de entradas ( $F_{(1,28)}=12,28$ ;  $p<0,01$ ) e % de tempo ( $F_{(1,28)}=9,76$ ;  $p<0,01$ ) nos braços abertos em relação ao grupo controle. A ANOVA não apresentou efeito significativo nas entradas e no tempo nos braços fechados do LCE. Na CBP, a ANOVA revelou um efeito significativo geral para o fator repetição, com um aumento do tempo gasto no compartimento preto no reteste em relação ao teste ( $F_{(1,28)}=14,07$ ;  $p<0,001$ ) (dados não mostrados), não foram observadas diferenças significativas na locomoção no compartimento branco, no preto, no tempo no compartimento branco e nas transições.



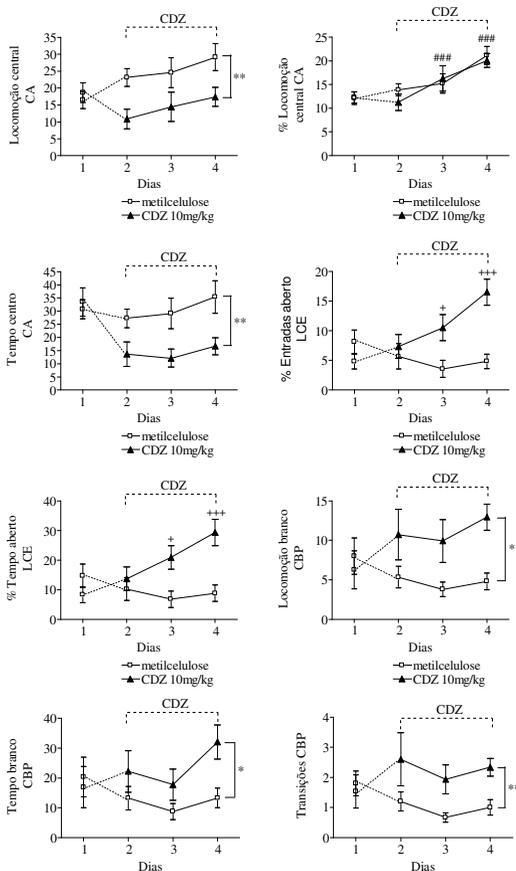
**Figura 13.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em dois dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE, locomoção, tempo no branco e transições da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratado e controle (n = 15). (\*), (\*\*) Representam diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente). (###) Representam um efeito geral de repetição com diferenças significativas entre o teste e o reteste ( $p < 0,001$ ).



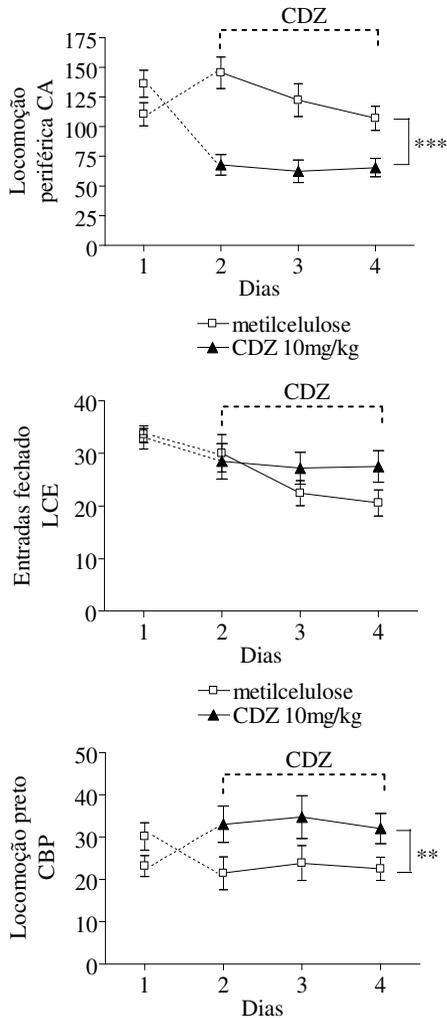
**Figura 14.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em dois dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica no CA, entradas no fechado do LCE, locomoção no preto da CBP. Barras e linhas verticais representam à média  $\pm$  EPM dos animais dos grupos tratados e controle (n = 15). (###) Representam um efeito geral de repetição com diferenças significativas entre o teste e o reteste ( $p < 0,001$ ).

### **5.7 Experimento 7: Efeito do CDZ em 4 Dias de Exposição Repetida ao Teste Triplo**

Os resultados do experimento 7 estão ilustrados nas Figuras 15 e 16. A ANOVA de medidas repetidas foi realizada somente para os dias 2, 3 e 4, pois no dia 1 todos os animais receberam metilcelulose. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator tratamento na locomoção central ( $F_{(1,28)}=8,78$ ;  $p<0,01$ ) e na locomoção periférica no CA ( $F_{(1,28)}=28,57$ ;  $p<0,001$ ), com uma diminuição na locomoção nestas duas áreas do grupo tratado em relação ao grupo controle. Um efeito significativo para o fator tratamento também foi encontrado para o tempo gasto no centro do CA ( $F_{(1,28)}=12,73$ ;  $p<0,01$ ), com o grupo tratado apresentando uma diminuição no tempo gasto no centro em relação ao grupo controle. A ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo geral para o fator repetição na % de locomoção central no CA ( $F_{(2,56)}=14,02$ ;  $p<0,001$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou um aumento na % de locomoção central no CA nos dias 3 e 4 em relação ao dia 2. No LCE, a ANOVA de medidas repetidas revelou a presença de interação entre os fatores repetição e tratamento para a % de entradas ( $F_{(2,56)}=4,86$ ;  $p<0,05$ ) e % de tempo ( $F_{(2,56)}=3,30$ ;  $p<0,05$ ) nos braços abertos. Os animais tratados nos dias 3 e 4 exploraram mais os braços abertos do que seus respectivos controles. Um efeito significativo geral para o fator repetição também foi encontrado para o tempo gasto nos braços fechados do LCE ( $F_{(2,56)}=9,45$ ;  $p<0,001$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição no tempo gasto nos braços fechados nos dias 3 e 4 em relação ao dia 2 (dados não mostrados). A ANOVA não apresentou efeito significativo no número de entradas nos braços fechados do LCE. Na CBP a ANOVA revelou efeito significativo para o fator tratamento com um aumento na locomoção ( $F_{(1,28)}=12,08$ ;  $p<0,01$ ) e no tempo gasto ( $F_{(1,28)}=7,34$ ;  $p<0,05$ ) no compartimento branco e no número de transições ( $F_{(1,28)}=9,45$ ;  $p<0,01$ ) do grupo tratado em relação ao grupo controle. Um aumento na locomoção ( $F_{(1,28)}=9,77$ ;  $p<0,01$ ) e no tempo gasto no compartimento preto ( $F_{(1,28)}=17,81$ ;  $p<0,001$ ) (dados não mostrados) do grupo tratado em relação ao grupo controle.



**Figura 15.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em quatro dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo no aberto do LCE, locomoção, tempo no branco e transições da CBP. ▲, □ e linhas verticais representam a média ± EPM dos animais do grupo tratado e controle (n = 15). (\*) e (\*\*) Representam diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). (###) Representa um efeito geral de repetição com diferenças significativas dos dias 3 e 4 em relação ao dia 2 (ANOVA seguida do teste *post-hoc* de Duncan,  $p < 0,001$ ). (+) e (+++) Representam o resultado do teste *post-hoc* de Duncan com diferenças significativas entre o grupo tratado no dia 3 e 4 e seus respectivos controles ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).



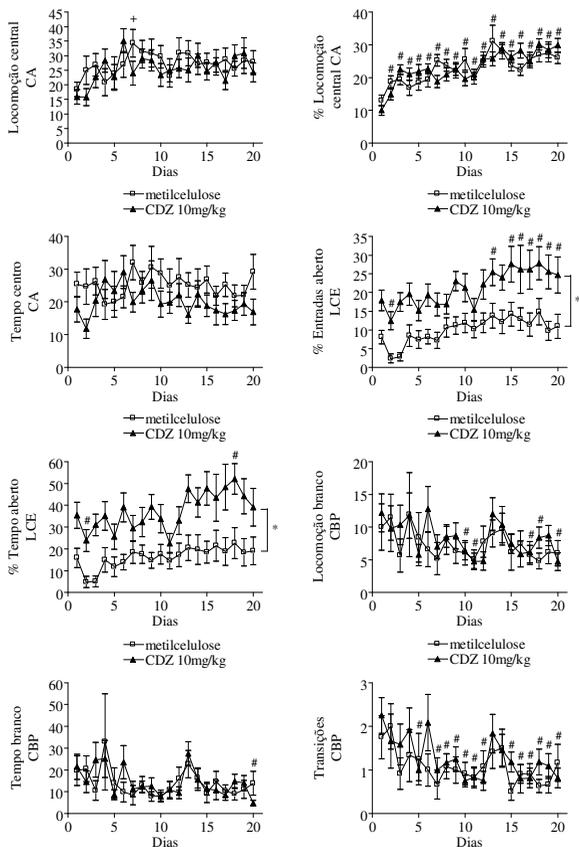
**Figura 16.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em quatro dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica no CA, entradas no fechado do LCE, locomoção no preto da CBP. ▲, □ e linhas verticais representam a média  $\pm$  EPM dos animais do grupo tratado e controle (n = 15). (\*\*) e (\*\*\*) Representam diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle (p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente).

### 5.8 Experimento 8: Efeito Crônico do CDZ no Teste Triplo

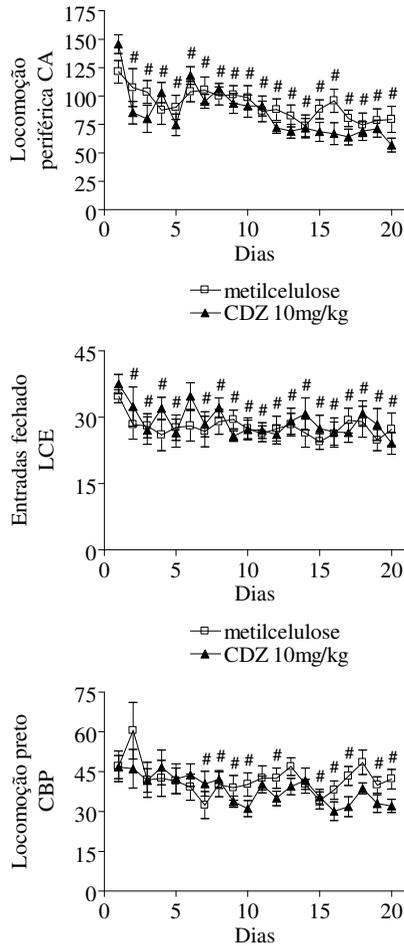
Os resultados do experimento 8 estão ilustrados nas Figuras 17 e 18. No CA a ANOVA de medidas repetidas revelou a presença de interação entre os fatores repetição e tratamento para a locomoção central ( $F_{(19,342)}=1,70$ ;  $p<0,05$ ). Os animais tratados do dia 7 se locomoveram menos no centro do CA do que seu respectivo controle. Um efeito significativo geral para o fator repetição também foi encontrado para a % de locomoção central no CA ( $F_{(19,342)}=12,89$ ;  $p<0,05$ ) e para a locomoção periférica no CA ( $F_{(19,342)}=7,26$ ;  $p<0,05$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou um aumento na % de locomoção central no CA nos dias 2 a 20 em relação ao dia 1, e uma diminuição na locomoção periférica no CA nos dias 2 a 20 em relação ao dia 1. A ANOVA não apresentou efeito significativo no tempo gasto no centro do CA. No LCE, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo para o fator tratamento, com um aumento na % de entradas ( $F_{(1,18)}=7,66$ ;  $p<0,05$ ) e na % de tempo nos braços abertos ( $F_{(1,18)}=7,58$ ;  $p<0,05$ ) do grupo tratado em relação ao grupo controle. Um efeito significativo geral para o fator repetição também foi encontrado na % de entradas ( $F_{(19,342)}=5,82$ ;  $p<0,05$ ) e na % de tempo nos braços abertos ( $F_{(19,342)}=3,59$ ;  $p<0,05$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição no dia 2 em relação ao dia 1, e um aumento nos dias 13, 15 a 20 em relação ao dia 1 na % de entradas nos braços abertos, na % de tempo gasto nos braços abertos ocorreu uma diminuição no dia 2 em relação ao dia 1, e um aumento no dia 18 em relação ao dia 1.

Foi observado também um efeito significativo geral para o fator repetição nas entradas ( $F_{(19,342)}=2,26$ ;  $p<0,05$ ) e no tempo gasto ( $F_{(19,342)}=1,88$ ;  $p<0,05$ ) nos braços fechados do LCE. Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição nas entradas nos braços fechados nos dias 2 a 5, 7 a 20 em relação ao dia 1, e um aumento no tempo gasto nos braços fechados nos dias 2, 12 a 14, 18 a 20 em relação ao dia 1 (dados não mostrados). Na CBP, a ANOVA de medidas repetidas revelou efeito significativo geral do fator repetição na locomoção no compartimento branco ( $F_{(19,342)}=2,13$ ;  $p<0,05$ ), no tempo gasto no compartimento branco ( $F_{(19,361)}=2,30$ ;  $p<0,05$ ), na locomoção no compartimento preto ( $F_{(19,342)}=4,51$ ;  $p<0,05$ ) e nas transições ( $F_{(19,342)}=2,93$ ;  $p<0,05$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou uma diminuição na locomoção no compartimento

branco nos dias 10, 11, 17, 18 e 20 em relação ao dia 1, bem como, uma diminuição no tempo gasto no compartimento branco no dia 20 em relação ao dia 1. Foi observado também uma diminuição na locomoção no compartimento preto nos dias 7 a 10, 12, 15 a 17, 19 e 20 em relação ao dia 1, e uma diminuição nas transições nos dias 5, 7 a 12 e 15 a 20 em relação ao dia 1. No compartimento preto da CBP a ANOVA de medidas repetidas também revelou um efeito significativo geral do fator repetição para o tempo gasto neste compartimento ( $F_{(19,342)}=2,52$ ;  $p<0,05$ ). Adicionalmente, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou um aumento no tempo gasto no compartimento preto nos dias 2, 12 a 14, 18 a 20 em relação ao dia 1 (dados não mostrados).



**Figura 17.** Comportamentos relacionados à ansiedade de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em 20 dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção, % locomoção e tempo no centro do CA, % de entradas e de tempo no aberto do LCE, locomoção, tempo no branco e transições da CBP. ▲, □ e linhas verticais representam a média  $\pm$  EPM dos animais do grupo tratado e controle ( $n = 12$ ). (\*) Representam diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle ( $p < 0,05$ ). (#) Representam o resultado do teste *post-hoc* de Duncan com diferenças significativas entre os dias de teste e o dia 1 ( $p < 0,05$ ). (+) Representam o resultado do teste *post-hoc* de Duncan com diferenças significativas entre o grupo tratado no dia 7 e seu respectivo controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18.** Comportamentos relacionados à locomoção de ratos Wistar machos tratados com metilcelulose (MC) ou clordiazepóxido (CDZ 10 mg/kg) em vinte dias de experimento no teste triplo. As variáveis comportamentais foram medidas em uma sessão de 15 min: locomoção periférica no CA, entradas no fechado do LCE, locomoção no preto da CBP. ▲, □ e linhas verticais representam a média ± EPM dos animais do grupo tratado e controle (n = 12). (#) Representam o resultado do teste *post-hoc* de Duncan com diferenças significativas entre os dias de teste e o dia 1 ( $p < 0,05$ ).

### ***5.9 Análise do Tempo Total em Cada Aparato do Teste Triplo***

A ANOVA não apresentou efeitos significativos entre os grupos experimentais (CDZ a 0, 0,5, 5 ou 10 mg/kg) no tempo total gasto em cada aparato do teste triplo. Os valores médios de tempo gasto (s) em cada aparato foram: CA:  $241,37 \pm 13,44$ , LCE:  $332,85 \pm 10,92$ , CBP:  $260,89 \pm 15,27$ , ou seja, o tempo foi repartido entre os aparatos de forma relativamente equilibrada, com pouco mais de 5 min sendo gastos no LCE, por exemplo.

## 6. DISCUSSÃO

Existem vários testes descritos na literatura para medir comportamentos relacionados à ansiedade em roedores de laboratório (LISTER, 1990; FILE, 1995; RAMOS e MORMÈDE, 1998; LITVIN *et al.*, 2008), que foram validados com base na semelhança relativa das respostas comportamentais, fisiológicas e farmacológicas (principalmente através de compostos benzodiazepínicos) frente a situações ameaçadoras em roedores e seres humanos (PELLOW *et al.*, 1985; LISTER, 1990; BLANCHARD *et al.*, 2008). Entretanto, muitas dúvidas ainda existem a respeito da relevância clínica dos diferentes testes comportamentais existentes (RAMOS e MORMÈDE, 1998). Sabe-se que, para uma avaliação mais completa do perfil emocional dos animais a serem estudados, é interessante utilizar diferentes testes e medidas comportamentais em uma mesma população (RAMOS *et al.*, 1997). Porém, o mesmo animal não pode ser testado ao mesmo tempo em diferentes testes comportamentais, situação esta que gera um problema, pois o perfil emocional do animal flutua ao longo do tempo (RAMOS e MORMÈDE, 1998; RAMOS, 2008). Para tentar resolver tal problema, propomos a integração física de três testes comportamentais de ansiedade (o CA, o LCE e a CBP), que denominamos teste triplo. Experimentos pilotos realizados em nosso laboratório sugeriram a utilidade desse modelo integrado para estudos experimentais de ansiedade (RAMOS *et al.*, 2008). Baseados nestes dados, pretendeu-se verificar os efeitos de três drogas conhecidas por modular a ansiedade (MDZ, PTZ e CDZ) no teste triplo.

No experimento 1, os ratos tratados com MDZ a 0,75 mg/kg mostraram uma redução dos comportamentos relacionados à ansiedade, através de um aumento na porcentagem de entradas e na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. Em contrapartida, nos braços fechados do LCE, esta dose provocou uma redução no número de entradas. Estes resultados são semelhantes aos experimentos realizados por Bertoglio e Carobrez (2002), onde MDZ a 1,0 mg/kg aumentou a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos e reduziu o número de entradas nos braços fechados do LCE. Não foi encontrado efeito significativo do MDZ sobre o comportamento exploratório de ratos nas áreas potencialmente aversivas do CA e da CBP, em acordo com o que foi mostrado por Chaouloff, Durand e Mormède (1997), onde o DZ 0,75 mg/kg aumentou a porcentagem de tempo nos braços abertos

do LCE, mas não aumentou o tempo de permanência no compartimento branco da CBP.

No experimento 2, o CDZ nas doses de 5 mg/kg e de 10 mg/kg produziu efeito ansiolítico demonstrado pelo aumento na porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE. Adicionalmente, a dose de 10 mg/kg também reduziu o número de entradas nos braços fechados do LCE e a locomoção no compartimento preto da CBP, sugerindo efeito sedativo desta dose, semelhante aos efeitos ansiolíticos e sedativos do MDZ no LCE já evidenciados (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002). Neste experimento, o CDZ também não teve efeito sobre os demais parâmetros avaliados no CA e CBP. Os resultados apresentados até aqui demonstram a sensibilidade do teste triplo a agentes ansiolíticos. Para que um teste possa ser considerado um modelo comportamental de ansiedade, o mesmo deve permitir a mensuração de respostas quantitativas/qualitativas em animais e responder à aplicação de drogas ansiolíticas/ansiógênicas no mesmo sentido em que estas drogas atuam em humanos (FILE, 1987).

No experimento 3, o PTZ demonstrou efeito em todos os aparatos do teste triplo, diferentemente dos experimentos anteriores. O PTZ a 10 mg/kg demonstrou efeito ansiógênico, reduzindo a locomoção central no CA, a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE e o a locomoção no compartimento branco da CBP. Porém, esta dose não afetou a locomoção periférica no CA, as entradas nos braços fechados do LCE e o a locomoção no compartimento preto da CBP. De fato, o PTZ em doses subconvulsivantes induz ansiedade agindo sobre o complexo receptor GABA-benzodiazepínico (PELLOW *et al*, 1985). Com 20 mg/kg, todavia, o PTZ reduziu todas as variáveis, com exceção da locomoção no compartimento preto da CBP, o qual está de acordo com seus efeitos ansiógênicos e hipolocomotores encontrados em outros estudos (PELLOW *et al*, 1985; CRUZ, FREI e GRAEFF, 1994; RAMOS *et al*, 1997). Curiosamente, o tratamento com o PTZ produziu efeito ansiógênico em todos os aparatos do teste triplo, enquanto que o MDZ e o CDZ produziram efeito ansiolítico somente no LCE, sem alterar os parâmetros avaliados no CA e na CBP.

A partir dos resultados apresentados nos experimentos 1 e 2, duas hipóteses surgiram na tentativa de explicar a ausência de efeito esperado do MDZ e do CDZ no CA e na CBP: (1) o CA e a CBP, mesmo individualmente, não são consistentemente sensíveis aos BDZs nas nossas condições experimentais; (2) estes testes, individualmente,

respondem consistentemente aos BDZs, mas quando fisicamente combinados, eles mudam sua natureza e perdem a sensibilidade. Com o intuito de testar essas hipóteses, investigamos o efeito do CDZ, separadamente, no CA e na CBP, nas mesmas doses utilizadas nos experimentos prévios (0,5, 5 e 10 mg/kg).

No CA, as três doses de CDZ reduziram significativamente o tempo gasto no centro em relação ao grupo controle e nenhum efeito significativo foi observado na locomoção central do aparato, diferente do efeito esperado, e em acordo com os dados mostrados pela revisão de Prut e Belzung (2003). Segundo estes autores, a administração aguda de agonistas de receptores BDZs, como por exemplo o diazepam (DZ), não mostrou efeito ansiolítico no CA em 31 % dos trabalhos analisados, enquanto outros 13 % mostraram efeito ansiogênico. Na CBP, nenhum efeito significativo do CDZ foi observado no tempo e na locomoção no compartimento branco, também diferente do esperado, mas corroboram dados da literatura, mostrando que ratos tratados com CDZ a 5 mg/kg reduziram os comportamentos relacionados à ansiedade no LCE, mas não mudaram a aproximação da área branca da CBP (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997).

Tomados em conjunto, estes resultados no CA e na CBP estão em total acordo com os experimentos 1 e 2 e, portanto, apóiam a primeira hipótese levantada, sugerindo que o CA e a CBP, individualmente, não são sensíveis aos BDZs, pelo menos em ratos, nas doses e nas condições experimentais utilizadas. Esta ausência de sensibilidade do CA e da CBP, mas não do LCE, ao CDZ, corrobora dados da literatura de que diferentes testes de ansiedade medem diferentes características emocionais (LISTER, 1990; FILE, 1995; RAMOS *et al*, 1997; HOLMES *et al*, 2001), ou ainda, que são moderadamente relacionados um ao outro (CHAOULOFF, DURAND e MORMÈDE, 1997). No entanto, dados da literatura mostram efeito de compostos que modulam o complexo receptor GABA/BDZ nos parâmetros observados no CA e na CBP. Wislowska-Stanek *et al*. (2006) mostraram um aumento do comportamento exploratório na área central do CA em ratos tratados com MDZ. Outro trabalho, realizado por Vendruscolo e colaboradores (2003), mostrou que ratos da linhagem SHR tratados com CDZ ou com NKP608, um antagonista de receptor NKP, se locomoveram mais e gastaram mais tempo na área central do CA do que seus respectivos controles. Na CBP, a injeção de muscimol, um agonista de receptor GABA, no núcleo basolateral da amígdala de ratos, mostrou efeito

ansiolítico, através de um aumento no tempo gasto no compartimento branco em relação ao grupo controle (BUENO, ZANGROSSI JR e VIANA, 2005).

Em relação à CBP, alguns fatores podem explicar a ausência de efeitos ansiolíticos na CBP nas nossas condições. Primeiramente, a CBP foi desenvolvida em camundongos, sendo amplamente utilizada nestes animais (CRAWLEY e GOODWIN, 1980; CRAWLEY, 1981; HASCOËT, BOURIN e DHONNCHADHA, 2001; TAKAO e MIYAKAWA, 2006). De fato, as revisões sobre CBP de Hascoët, Bourin e Dhonnchadha (2001) e Bourin e Hascoët (2003) apresentam apenas trabalhos realizados com camundongos. Além disso, todos os nove trabalhos apresentados por Bourin e Hascoët (2003) com administração aguda de compostos BDZs em camundongos mostraram efeito ansiolítico na CBP. Outro ponto a ser considerado, é que a CBP para camundongos apresenta tipicamente a dimensão externa de 46x27x30cm, com algumas pequenas variações apresentadas pela literatura (para revisão ver BOURIN e HASCOËT, 2003). Em nosso estudo, realizado com ratos, a CBP apresenta 45x27x27cm, sugerindo que ela seja muito pequena para os ratos, sendo uma possível explicação para a insensibilidade aos BDZs, já que Bilkei-Gorzó, Gyertyán e Lévy, (1998) mostraram que os ratos tratados com CDZ, aumentaram o tempo de locomoção no compartimento branco em relação ao grupo tratado com o ansiogênico mCPP, em uma CBP com os compartimentos (branco e preto) medindo 39x 20x29 cm. Por outro lado, um grupo de pesquisadores mostraram, o efeito ansiolítico do muscimol no comportamento de ratos em uma CBP com as dimensões 48x24x27cm (BUENO, ZANGROSSI JR e VIANA, 2005). Além disso, Perez de la Mora *et al.* (2006) mostraram efeito ansiolítico do MPEP, um antagonista de receptor de glutamato mGluR5, no comportamento de ratos em uma CBP de 45x27x27cm.

Estudos mostram que a pré-exposição de roedores ao LCE, altera a sua resposta comportamental e farmacológica na re-exposição neste aparato (FILE, 1990; HOLMES *et al.*, 2001; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). File (1990) mostrou que uma simples experiência sem droga no LCE reduz significativamente o efeito ansiolítico do CDZ em camundongos. Desta maneira, foi avaliada a resposta comportamental e farmacológica ao CDZ em testes repetidos no teste triplo. Para isto, três experimentos foram realizados: (1) Efeito do reteste nos efeitos do CDZ no teste triplo (Experimento 6), (2) Efeito do CDZ em quatro dias de

exposição repetida ao teste triplo (Experimento 7) e (3) Efeito crônico do CDZ (Experimento 8).

No experimento 6, os ratos tratados com CDZ 10 mg/kg aumentaram a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE em relação ao grupo controle no teste e no reteste. Esses resultados mostram uma ausência de *one trial tolerance* (OTT) no teste triplo. Esse fenômeno se caracterizaria por uma redução das entradas nos braços abertos e uma perda da eficácia dos BDZs a partir de uma segunda exposição ao LCE (FILE e ZANGROSSI JR, 1993; CAROBREZ e BERTOGGIO, 2005; ALBRECHET-SOUZA, BORELLI E BRANDÃO, 2008). Na literatura foram descritas algumas situações experimentais onde não ocorre OTT na re-exposição ao LCE, quando se utiliza uma dose amnésica de CDZ (75 mg/kg) (FILE *et al*, 1990), quando a sessão de teste/ reteste é aumentada para 10 min (FILE *et al*, 1993), quando a sessão de teste é reduzida a 1 min de duração (DAL-COL *et al*, 2003) e quando se introduz uma nova situação de conflito para o animal (PEREIRA *et al*, 1999; ANDREATINI, VITAL e SANTOS, 2003).

A dose amnésica de CDZ não seria o motivo para a ausência de OTT apresentada neste experimento, pois a dose de 10 mg/kg de CDZ utilizada é 7,5 vezes menor que a dose amnésica utilizada por File e colaboradores em 1990. Em relação à questão citada anteriormente, de sessões de teste e de reteste de 10 min terem revelado uma ausência de OTT (FILE *et al*, 1993), nós realizamos a análise do tempo total que os animais ficam em cada aparato do teste triplo (conforme mostrado no item 5.9), e verificamos que apesar dos animais no experimento analisado passarem mais tempo no LCE, esse tempo não chega a completar 10 min, com os animais passando apenas 5 min e meio no LCE. O que não justificaria a ausência de OTT neste aparato dentro do teste triplo. Portanto, este dado considerado isoladamente não justificaria a ausência de OTT neste aparato dentro do teste triplo. Entretanto, estudos futuros com uma sessão de apenas 5 min no protocolo de teste e reteste no teste triplo poderão avaliar melhor essa questão.

Outro ponto a ser considerado é que apesar dos animais, em 15 minutos, terem a possibilidade de visitar todos os três aparatos, esse tempo, talvez, não seja o suficiente para que eles adquiram uma aprendizagem aversiva. Segundo dados da literatura, a ocorrência de OTT poderia ser explicada também por uma aprendizagem aversiva, referente ao perigo inerente aos braços abertos, adquirida na primeira

exposição ao LCE, reduzindo a exploração nos braços abertos em exposições subseqüentes (RODGERS e SHEPHERD, 1993; RODGERS *et al.*, 1995; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2000; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002; VARGAS, CUNHA e ANDREATINI, 2006; ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2007). Entretanto, a diminuição na atividade exploratória nos braços abertos do grupo controle no reteste em relação ao teste (Experimento 6), sugere a aquisição de algum tipo de aprendizagem aversiva aos braços abertos por estes animais. Portanto, os resultados sugerem que a integração física dos três aparatos (CA, LCE, CBP) introduz uma situação de conflito para os ratos na re-exposição ao LCE, em acordo com os experimentos realizados por Andreatini *et al.* (2003), que modificaram o protocolo de teste/reteste ao introduzir no reteste um objeto desconhecido no braço aberto ou alimento dentro do ambiente experimental e, portanto, mantendo o conflito aproximação/esquiva. Adicionalmente, a introdução de estímulos aversivos nos braços fechados como, luz de 100W e vento quente, na primeira exposição ao LCE, permitiu a manifestação do efeito ansiolítico do CDZ na segunda exposição ao aparato (PEREIRA *et al.*, 1999).

O fenômeno de OTT indica ausência do conflito aproximação/esquiva no reteste (RODGERS e SHEPHERD, 1993; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003). Desta maneira, o conflito é progressivamente resolvido à medida que o animal se familiariza com o aparato e, conseqüentemente, conhecendo o perigo inerente dos braços abertos do LCE, deixando de explorá-los no reteste (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2003; ALBRECHET-SOUZA *et al.*, 2007; ROY *et al.*, 2009). Estudos mostram que o animal tende a diminuir a exploração dos braços abertos já nos últimos minutos da primeira exposição ao aparato (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005), mostrando portanto, uma aprendizagem aversiva rápida aos braços abertos (HOLMES e RODGERS, 1998).

Pode-se sugerir também, que esse conflito presente no teste triplo na re-exposição, seja resultado de um possível caráter aversivo gerado pelo CA e pela CBP no final dos braços fechados do LCE, em acordo com o experimento realizado por Pereira *et al.* (1999) descrito acima. Assim, segundo o trabalho realizado por Costall *et al.* (1989), a luminosidade de 400 lux no compartimento branco da CBP, foi suficientemente aversiva para reduzir o tempo gasto, os *rearings* e a locomoção neste compartimento. Outro trabalho, realizado por Chaouloff, Durand e Mormède (1997) mostrou que diferenças

marcantes na intensidade de luz entre os compartimentos branco e preto (700 lux/7 lux) da CBP reduzem o número de entradas de ratos no compartimento branco, prejudicando o efeito ansiolítico do DZ e do CDZ. O compartimento branco da CBP utilizada em nossos experimentos apresenta luminosidade de 750 lux, portanto, supostamente bastante aversivo. Além disso, o compartimento preto da CBP que utilizamos apresenta a luminosidade de 20 lux, o que também é bastante contrastante com a luminosidade do compartimento branco, podendo interferir também na atividade no compartimento branco conforme já descrito. Estes fatores talvez explicariam a ausência de efeito do CDZ na CBP nas nossas condições, diferentemente do trabalho realizado por Bueno, Zangrossi Jr e Viana (2005), que mostraram efeito ansiolítico do muscimol sob o comportamento de ratos em uma CBP com a luminosidade do compartimento branco de apenas 60 lux. Experimentos futuros poderão ser realizados em nosso laboratório, para avaliar o comportamento de ratos no teste triplo com uma luminosidade na CBP menos contrastante e também menos aversiva. No CA, a ausência de paredes na região central do aparato o torna mais aversivo, devido a baixa possibilidade de realizar tigmotaxia (VALLE, 1970; TREIT *et al*, 1993). Ou ainda, podemos sugerir, que este conflito presente na re-exposição seja resultado da complexidade representada pela integração dos três aparatos.

No CA ocorreu uma diminuição na locomoção periférica no reteste em relação ao teste. Isso pode sugerir a ocorrência de um processo de habituação neste aparato com a repetição. Segundo Platel e Porsolt (1982), usualmente, a exposição repetida a um novo ambiente pode levar à habituação da resposta comportamental, normalmente indicada por uma redução na atividade global. Nenhum efeito foi encontrado na locomoção central do aparato, apenas um aumento na porcentagem de locomoção central no CA no reteste em relação ao teste, o que vai contra a hipótese citada anteriormente de aversão gerada pelo CA dentro do teste triplo. Adicionalmente, nenhum efeito de tratamento foi observado nas duas sessões. Pelo contrário, os animais tratados reduziram o tempo no centro do CA tanto no teste quanto no reteste, concordando com a total ausência de efeito ansiolítico do CDZ demonstrada nos experimentos anteriores com somente uma sessão de teste no CA individualmente.

Em relação à CBP, ocorreu um aumento do tempo gasto no compartimento preto (dados não mostrados) no reteste em relação ao

teste, mas nenhum efeito do tratamento foi observado. Nenhum efeito foi observado também na locomoção no compartimento branco e no preto, no tempo gasto no compartimento branco e nas transições na CBP. Segundo Bourin e Hascoët (2003) as transições foram relatadas como um índice de atividade exploratória, por causa da habituação ao longo do tempo, e o tempo gasto em cada compartimento como um reflexo de aversão. Deste modo, o aumento do tempo gasto no compartimento preto no reteste reforça a segurança que este compartimento representa para os animais, ao contrário do compartimento branco que é bastante aversivo devido a alta luminosidade. Drogas ansiolíticas aumentam a locomoção e o tempo gasto no compartimento branco (IMAZUMI *et al*, 1994), o que não aconteceu neste experimento, evidenciando novamente a total ausência de efeito ansiolítico do CDZ na CBP. Todos esses resultados corroboram dados da literatura que demonstram a ineficácia dos BDZs na re-exposição, no teste *four-plate* (HASCOËT, BOURIN E COUETOUX DU TERTRE, 1997), na esquiva ao odor de gato (MCGREGOR e DIELENBERG, 1999) e na CBP (HOLMES *et al*, 2001). Particularmente no caso do CA e da CBP, a ineficácia do CDZ não aparece só na re-exposição, mas também na primeira exposição, reforçando a hipótese de que esses testes não são, consistentemente, sensíveis aos efeitos dos BDZs nas nossas condições experimentais e que não avaliam os mesmos fenômenos psicobiológicos que o LCE (RAMOS, 2008).

No experimento 7, os ratos tratados com CDZ a 10 mg/kg aumentaram gradualmente a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE em relação aos seus respectivos controles no terceiro e quarto dias, mostrando ausência de OTT nestes dias. No entanto, no dia 2, que foi o primeiro dia em que os animais receberam o tratamento com CDZ, não observamos efeito ansiolítico deste tratamento e, portanto, houve a ocorrência de OTT neste dia. Este resultado está de acordo com File (1990), que demonstrou que uma simples experiência sem droga no LCE pode reduzir significativamente o efeito ansiolítico do CDZ em camundongos. Entretanto este resultado é intrigante, pois no experimento anterior (Experimento 6) o CDZ a 10 mg/kg mostrou efeito no primeiro e no segundo dia e, aqui, somente no terceiro e quarto dias. Isto sugere que a presença de efeito ansiolítico aos BDZs em exposições repetidas no teste triplo, dependa da condição de receber a administração da droga desde o primeiro dia. O conflito aproximação/esquiva parece existir para os grupos tratado e controle

desde o primeiro dia, porém a presença do conflito parece não ser a única condição para que a droga faça efeito na re-exposição.

Nenhum efeito foi encontrado nas entradas nos braços fechados, somente no tempo gasto nos braços fechados (dados não mostrados), que apresentou uma diminuição nos dias 3 e 4 em relação ao dia 2, sugerindo que os braços fechados possivelmente estejam adquirindo algum caráter aversivo, possivelmente ocasionado pela presença do CA e da CBP ao final dele, como observado no trabalho realizado por Pereira *et al.* (1999), que associaram estímulos aversivos aos braços fechados, impedindo o surgimento do fenômeno de OTT. Os resultados apresentados nos braços abertos demonstram que a ausência de OTT no teste triplo ocorre também em quatro dias de exposição repetida ao aparato, sugerindo que o conflito aproximação/esquiva se mantém no teste triplo mesmo após quatro exposições repetidas.

No CA observamos uma diminuição na locomoção periférica do grupo tratado em relação ao grupo controle, sugerindo a ocorrência de um processo de habituação, conforme mostrado neste aparato no experimento 6. Entretanto, ocorreu um aumento na porcentagem de locomoção central no terceiro e quarto dias em relação ao dia 2, indo contra a hipótese de aversão gerada por este aparato, conforme observado também no experimento 6. Ocorreu uma redução na locomoção central e no tempo gasto no centro do grupo tratado em relação ao grupo controle. A ausência de efeito do CDZ observada, concorda novamente com a hipótese de baixa sensibilidade do CA aos BDZs.

Na CBP, os ratos tratados com CDZ 10 mg/kg aumentaram a locomoção, o tempo gasto no compartimento branco e as transições a partir do segundo dia, diferentemente dos experimentos anteriores e dos experimentos realizados por Holmes *et al.* (2001), onde o CDZ não aumentou a porcentagem de locomoção e do tempo gasto no compartimento branco de camundongos re-expostos a CBP. Este resultado parece controverso quando comparado aos demais resultados da CBP obtidos tanto individualmente (Experimento 5) quanto a partir do teste triplo (Experimento 2 e 6). Este fato poderia ser explicado por duas hipóteses: (1) A CBP estaria originando um conflito aproximação/esquiva a partir de um determinado número de exposições ao aparato e, portanto, se tornando sensível aos BDZs após alguns testes repetidos; (2) talvez a luminosidade supostamente muito aversiva do compartimento branco da CBP necessita de um grau de habituação do

animal; (3) inconsistência no resultado. Caso a primeira hipótese estivesse correta, seria confirmada através da manifestação de um mesmo perfil de resposta comportamental dos animais na CBP no experimento crônico (Experimento 8, abaixo). Já a segunda hipótese, requer a realização de outros experimentos com uma luminosidade menos aversiva. De outra maneira, poderia se tratar de uma inconsistência no resultado, ou seja, de um falso positivo.

De fato, dados farmacológicos envolvendo diferentes testes de ansiedade são frequentemente inconsistentes ao longo dos estudos (RAMOS, 2008). Isso ocorre devido a possíveis variações no background genético dos animais, no protocolo experimental e no ambiente de teste (WAHLSTEN *et al*, 2006). Como exemplo de variação ambiental, Bourin *et al.* (2007) demonstraram que os testes animais de ansiedade são bastante suscetíveis a mudanças climáticas, apesar de serem realizados nas mesmas condições experimentais.

Segundo Chaouloff, Durand e Mormède (1997), dados da literatura mostram que os BDZs podem aumentar a locomoção e o tempo no compartimento branco, diminuindo ao mesmo tempo, ou não, a exploração no compartimento preto. De fato, ocorreu também um aumento na locomoção e no tempo gasto no compartimento preto (dado não mostrado) do grupo tratado em relação ao grupo controle. Esses resultados em conjunto, apontam para um aumento da atividade exploratória geral na CBP.

No experimento 8, os ratos tratados com CDZ 10 mg/kg aumentaram a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos do LCE em relação ao grupo controle durante os 20 dias de teste, ou seja, houve uma ausência total de OTT. Nos braços fechados ocorreu uma redução no número de entradas em boa parte dos dias em relação ao dia 1, sugerindo a ocorrência de habituação ao longo dos dias. No CA, ocorreu uma redução na locomoção periférica nos dias 2 a 20 em relação ao dia 1, também concordando com a hipótese de habituação. Os ratos tratados com CDZ no dia 7 mostraram uma diminuição na locomoção central em relação ao seu respectivo grupo controle e nenhum efeito foi observado no tempo gasto no centro do aparato, isso mostra a baixa sensibilidade do CA as BDZs nas nossas condições, e está em acordo com a revisão de Prut e Belzung (2003), onde encontraram efeito ansiolítico de tratamentos agudos e crônicos, com CDZ e MDZ no CA em apenas metade dos estudos analisados.

Na CBP, houve uma redução na locomoção no compartimento branco e no preto, e no número de transições na maioria dos dias em relação ao dia 1, sugerindo habituação. Nenhum efeito do tratamento foi observado na CBP, evidenciando a ausência de efeito do CDZ neste aparato também neste experimento. O efeito geral de repetição apresentados no CA e na CBP não seguem um padrão gradual de aumento ou diminuição dos parâmetros avaliados ao longo dos dias, esse fator juntamente com a ausência de efeito do CDZ nestes aparatos, apóia mais ainda a hipótese de insensibilidade destes testes comportamentais as BDZs, nas nossas condições experimentais. A ausência de efeito ansiolítico do CDZ na CBP em vinte dias de exposição repetida sugere a ocorrência de um resultado falso positivo nos parâmetros avaliados na área aversiva da CBP no experimento anterior (Experimento 7). Conforme o perfil comportamental apresentado nos Experimentos 6 e 7, o LCE mostra um padrão gradual de aumento na porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos dos animais tratados com CDZ a 10 mg/kg sugerindo a manutenção do conflito aproximação/esquiva também ao longo dos 20 dias de exposição, apontando o teste triplo como uma ferramenta promissora também para avaliação dos efeitos de tratamentos crônicos. Além de permitir avaliar diferentes aspectos da emocionalidade simultaneamente, evitando os efeitos da experiência prévia, das manipulações e intervalos entre os testes, conforme ocorre em baterias de testes.

A ausência de efeito do CDZ no CA e na CBP, neste experimento, corrobora os resultados apresentados nos experimentos 1, 2, 4, 5, 6 e parcialmente os resultados do experimento 7, além de sugerir que os testes do CA e da CBP talvez não obedeçam aos critérios clássicos de comportamentos relacionados à ansiedade, reforçando dados já existentes (LISTER 1990; FILE 1995; Ramos *et al*, 1997; HOLMES *et al*, 2001). De fato, os testes podem ser mais apropriados para um tipo de transtorno de ansiedade do que para outro (BOURIN *et al*, 2007).

O presente estudo demonstra que o teste triplo provê índices relacionados à ansiedade, pois responde a agentes ansiolíticos, como o MDZ e o CDZ, e a agentes ansiogênicos, como o PTZ. Também provê índices relacionados à locomoção, os quais foram influenciados por alguns dos tratamentos apresentados. A integração dos três aparatos (CA, LCE e CBP) com diferentes significados psicobiológicos provoca uma resposta emocional nos animais na re-exposição ao LCE diferente daquela que acontece na re-exposição no LCE tradicional. Porém, ainda

não é possível caracterizar, exatamente, o tipo de perfil emocional apresentado pelos animais no teste triplo.

Em suma, estes dados apontam o teste triplo como uma ferramenta promissora na avaliação de drogas ansiolíticas administradas de forma aguda e crônica. O efeito ansiolítico do CDZ, demonstrado através do aumento na exploração das áreas aversivas do LCE pelos animais tratados também em exposições repetidas, sugere a introdução de um conflito na re-exposição ao teste triplo, talvez devido à complexidade deste aparato e, não devido a um tempo aumentado que os animais ficariam no LCE, conforme demonstrado na análise do tempo total em cada aparato. A ausência de efeito do MDZ e do CDZ no CA e na CBP, individualmente e no teste triplo, indicam que, nas condições experimentais utilizadas, os testes comportamentais (CA, LCE, CBP) avaliam diferentes características emocionais, ou ainda, que o CA e a CBP não são consistentemente sensíveis aos BDZs em ratos.

Por fim, a validação do teste triplo traz como perspectivas futuras, traçar um perfil emocional completo dos roedores neste novo teste, tornando necessários estudos envolvendo a avaliação com outros graus de luminosidade de acordo com dados da literatura (por exemplo um CA fortemente iluminado), e com o tempo de 5 min no protocolo de teste e reteste. A avaliação minuto a minuto do comportamento dos animais dentro de cada sessão e entre as sessões de teste, o que permitirá verificar as estratégias comportamentais adotadas pelos animais ao longo do tempo. A análise dos comportamentos de avaliação de risco e como eles acontecem diante de situações potencialmente aversivas (BLANCHARD *et al*, 1993), que permitirá verificar se a integração física dos três aparatos (CA, LCE e CBP) provoca algum tipo de mudança no perfil deste comportamento em comparação a cada um dos três aparatos na forma tradicional.

Verificar o nível de corticosterona plasmática nos animais durante o teste, pois o aumento de corticosterona no plasma acontece nos roedores durante reações de medo, como acontece na exposição ao LCE tradicional (PELLOW *et al*, 1985). Assim, ajudará a identificar as situações estressoras para os animais dentro do teste triplo. Estudos com drogas que prejudicam e facilitam a aprendizagem e a memória para verificar como se desenvolve o processo de aprendizagem e memória dos animais diante da complexidade do teste triplo. Estudos com outras classes de drogas utilizadas na clínica para o tratamento dos transtornos de ansiedade, com o objetivo de verificar se este aparato é sensível

também a estes compostos. E, finalmente, é de grande importância avaliar a neurobiologia dos comportamentos relacionados à ansiedade no teste triplo.

## 7. CONCLUSÃO

A sensibilidade do teste triplo aos ansiolíticos benzodiazepínicos, midazolam e clordiazepóxido, bem como, ao ansiogênico pentilenotetrazol, tornam este novo paradigma uma ferramenta promissora para avaliação de drogas ansiolíticas sob o tratamento agudo e crônico. A ausência de efeito das BDZs no CA e na CBP nas nossas condições experimentais, indicam que os testes comportamentais apresentam diferentes significados psicobiológicos e/ou que estes dois aparatos não são consistentemente sensíveis as BDZs em ratos.

O teste triplo poderá proporcionar uma melhor compreensão do estado emocional dos roedores, do significado dos testes envolvidos e do fenômeno de *one trial tolerance*. Todavia, a investigação futura de mais parâmetros etológicos e com diferentes classes de drogas é necessária a fim de se complementar a validação deste novo paradigma e desvendar o significado psicobiológico do teste triplo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G. e Brandão, M. L. Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. J Neurosci Methods, v.169, n.1, p.109-118. 2008.

Albrechet-Souza, L., Cristina De Carvalho, M., Rodrigues Franci, C. e Brandão, M. L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. Horm Behav, v.52, n.2, p.267-273. 2007.

American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Porto Alegre: Artmed, 2002

Andrade, L. H. S. G. e Gorenstein, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. Rev Psiq Clin, v. 25, p. 285-290. 1998.

Andreatini, R. e Bacellar, L. F. Animal models: trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.24, n.4, p.549-560. 2000.

Andreatini, R., Vital, M. A. B. F. e Santos, G. L. The reinstatement of conflict reverses the one-trial tolerance to diazepam on elevated plus-maze. Eur. Neuropsychopharmacol., v.13 (Suppl. 4), p.S378-S379. 2003.

Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. Anim Behav, v.21, n.2, p.205-235. 1973.

Baldwin, D. S. e Garner, M. How effective are current drug treatments for anxiety disorders, and how could they be improved? In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. e Nutt, D. (Ed.). Handbook of anxiety and fear. Amsterdam: Elsevier - Academic Press, 2008. p.141-158.

Barnett, S. A. The rat: a study in behavior. Chicago: The University of

Chicago Press, 1975.

Bertoglio, L. J., Anzini, C., Lino-De-Oliveira, C. e Carobrez, A. P. Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze Trial 2 in rats. Behav Brain Res, v.162, n.1, p.99-107. 2005.

Bertoglio, L. J. e Carobrez, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. Behav Brain Res, v.108, n.2, p.197-203. 2000.

\_\_\_\_\_. Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. Pharmacol Biochem Behav, v.73, n.4, p.963-969. 2002.

\_\_\_\_\_. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.72, n.1-2, p.449-455. 2002.

\_\_\_\_\_. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. Psychopharmacology (Berl), v.170, n.4, p.335-342. 2003.

\_\_\_\_\_. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. Behav Pharmacol, v.15, n.1, p.45-54. 2004.

Bertoglio, L. J., Joca, S. R. e Guimaraes, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. Behav Brain Res, v.175, n.1, p.183-188. 2006.

Bilkei-Gorzó, A., Gyertyán, I. e Lévy, G. mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats – a new method for screening anxiolytic activity. Psychopharmacology, v. 136, p.291-298. 1998.

Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. e Nutt, D. Introduction to the handbook on fear and anxiety. In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. e Nutt, D. (Ed.). Handbook of anxiety and fear. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008.

Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J. e Blanchard, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. Behav Brain Res, v.58, n.1-2, p.155-165. 1993.

Bourin, M. e Hascoet, M. The mouse light/dark box test. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, p.55-65. 2003.

Bourin, M., Petit-Demouliere, B., Dhonnchadha, B. N. e Hascoet, M. Animal models of anxiety in mice. Fundam Clin Pharmacol, v.21, n.6, Dec, p.567-74. 2007.

Bueno, C. H., Zangrossi Jr., H. e Viana, M. B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has na anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transitions test. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 38, p. 1697-1701. 2005.

Canteras, N. S. e Blanchard, D. C. A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. e Nutt, D. (Ed.). Handbook of anxiety and fear. Amsterdam: Elsevier - Academic Press, 2008. p.141-158.

Carobrez, A. P. e Bertoglio, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev, v.29, n.8, p.1193-1205. 2005.

Carobrez, A. P., Teixeira, K. V. e Graeff, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. Neurosci Biobehav Rev, v.25, n.7-8, p.697-709. 2001.

Castillo, A. R. G. L., Rocondo, R., Asbahr, F. R. e Manfro, G. G. Transtornos de ansiedade. Rev Bras Psiquiatr, v.22, n.suppl. 2, p.20-23. 2000.

Chaouloff, F., Durand, M. e Mormède, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. Behav Brain Res, v.85, n.1, p.27-35. 1997.

Costall, B., Hendrie, C. A., Kelly, M. E. e Naylor, R. J. Actions of sulpiride and tiapride in a simple model of anxiety in mice. Neuropharmacology, v.26, n.2-3, p.195-200. 1987.

Costall, B., Jones, B. J., Kelly, M. E., Naylor, R. J. e Tomkins, D. M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav, v.32, n.3, p.777-85. 1989.

Crawley, J. e Goodwin, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav, v.13, n.2, p.167-170. 1980.

Crawley, J. N. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. Pharmacol Biochem Behav, v.15, n.5, p.695-699. 1981.

Cruz, A. P. M., Frei, F. e Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.49, n.1, p.171-176. 1994.

Dal-Col, M. L., Pereira, L. O., Rosa, V. P., Calixto, A. V., Carobrez, A. P. e Faria, M. S. Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. Pharmacol Biochem Behav, v.74, n.2, p.395-400. 2003.

Dawson, G. R., Crawford, S. P., Stanhope, K. J., Iversen, S. D. e Tricklebank, M. D. One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze may be due to locomotor habituation, not repeated drug exposure. Psychopharmacology (Berl), v.113, n.3-4, p.570-572. 1994.

Ennaceur, A., Michalikova, S., Van Rensburg, R. e Chazot, P. L. Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. Behav Brain Res, v.174, n.1, p.9-38. 2006.

Fidecka, S. e Pirogowicz, E. Lack of interaction between the behavioral effects of ketamine and benzodiazepines in mice. Pol J Pharmacol, v.54, n.2, p.111-117. 2002.

File, S. E. The contribution of behavioural studies to the neuropharmacology of anxiety. Neuropharmacology, v.26, n.7B, p.877-886. 1987.

\_\_\_\_\_. One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. Psychopharmacology (Berl), v.100, n.2, p.281-282. 1990.

\_\_\_\_\_. Animal models of different anxiety states. Adv Biochem Psychopharmacol, v.48, p.93-113. 1995.

File, S. E., Andrews, N., Wu, P. Y., Zharkovsky, A. e Zangrossi, H., Jr. Modification of chlordiazepoxide's behavioural and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. Eur J Pharmacol, v.218, n.1, p.9-14. 1992.

File, S. E., Gonzalez, L. E. e Gallant, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. Neuropsychopharmacology, v.19, n.5, p.397-405. 1998.

\_\_\_\_\_. Role of the dorsomedial hypothalamus in mediating the response to benzodiazepines on trial 2 in the elevated plus-maze test of anxiety. Neuropsychopharmacology, v.21, n.2, p.312-320. 1999.

File, S. E., Mabbutt, P. S. e Hitchcott, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl), v.102, n.1, p.98-101. 1990.

File, S. E. e Zangrossi Jr, H. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? Psychopharmacology (Berl), v.110, n.1-2, p.240-244. 1993.

File, S. E., Zangrossi Jr, H., Viana, M., Graeff, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? Psychopharmacology (Berl), v. 111, p. 491-494. 1993

Gentsch, C., Lichtsteiner, M. e Feer, H. Open field and elevated plus-

maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. Behav Brain Res, v.25, n.2, p.101-107. 1987.

Gerlai, R., Blanchard, R. e Blanchard, C. Animal models of anxiety: the ethological perspective. In: Fisch, G. S. e Flint, J. (Ed.). Contemporary clinical neuroscience: transgenic and knockout models of neuropsychiatric disorders. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2006. p.221-236.

Gomes, K. S. e Nunes-De-Souza, R. L. Implication of the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> (but not 5HT<sub>1A</sub>) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.33, n.7, p.1261-1269. 2009.

Gordon, J. A. e Hen, R. Genetic approaches to the study of anxiety. Annu Rev Neurosci, v.27, p.193-222. 2004.

Grillon, C. Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. Psychopharmacology (Berl), v.199, n.3, p.421-437. 2008.

Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. J Comp Psychol, v.18, n.3, p.385-403. 1934.

Handley, S. L. e Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.327, n.1, p.1-5. 1984.

Hascoet, M., Bourin, M. e Couetoux Du Tertre, A. Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. Pharmacol Biochem Behav, v.58, n.4, p.1131-1138. 1997.

Hascoet, M., Bourin, M. e Dhonnchadha, B. A. The mouse light-dark paradigm: a review. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.25, n.1, p.141-166. 2001.

Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav, v.54,

n.1, p.21-30. 1996.

Hohoff, C. Anxiety in mice and men: a comparison. J Neural Transm, v.116, n.6, p.679-687. 2009.

Holmes, A., Iles, J. P., Mayell, S. J. e Rodgers, R. J. Prior test experience compromises the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in the mouse light/dark exploration test. Behav Brain Res, v.122, n.2, p.159-167. 2001.

Holmes, A. e Rodgers, R. J. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? Pharmacol Biochem Behav, v.60, n.2, p.473-488. 1998.

\_\_\_\_\_. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev, v.23, n.7, p.971-980. 1999.

Imaizumi, M., Suzuki, T., Machida, H. e Onodera, K. A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, v.14, n.2, p.83-91. 1994.

Kalueff, A. V., Keisala, T., Minasyan, A., Kumar, S. R., Laporte, J. L., Murphy, D. L. e Tuohimaa, P. The regular and light-dark Suok tests of anxiety and sensorimotor integration: utility for behavioral characterization in laboratory rodents. Nat Protoc, v.3, n.1, p.129-136. 2008.

Kalueff, A. V., Wheaton, M. e Murphy, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. Behav Brain Res, v.179, n.1, p.1-18. 2007.

Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J. e Morato, S. Thigmotactic responses in an open-field. Braz J Med Biol Res, v.41, n.2, p.135-140. 2008.

Leonardo, E. D. e Hen, R. Anxiety as a developmental disorder.

Neuropsychopharmacology, v.33, n.1, p.134-140. 2008.

Lipkind, D., Sakov, A., Kafkafi, N., Elmer, G. I., Benjamini, Y. e Golani, I. New replicable anxiety-related measures of wall vs center behavior of mice in the open field. J Appl Physiol, v.97, n.1, p.347-359. 2004.

Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl), v.92, n.2, p.180-185. 1987.

\_\_\_\_\_. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmacol Ther, v.46, n.3, p.321-340. 1990.

Litvin, Y., Pentkowski, N. S., Pobbe, R. L., Blanchard, D. C. e Blanchard, R. J. Unconditioned models of fear and anxiety. In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. e Nutt, D. (Ed.). Handbook of anxiety and fear. Amsterdam: Elsevier - Academic Press, 2008. p.81-100.

Marks, I. M. Fears, phobias and rituals. London: Oxford University Press, 1987. 682 p.

Mcgregor, I. S. e Dielenberg, R. A. Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. Psychopharmacology (Berl), v.147, n.2, p.174-181. 1999.

Montgomery, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. J Comp Physiol Psychol, v.48, n.4, p.254-260. 1955.

Nicoll, R. A., Malenka, R. C. e Kauer, J. A. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. Physiol Rev, v.70, n.2, p.513-565. 1990.

Ohl, F. Testing for anxiety. Clinical Neuroscience Research, v.3, n.4-5, p.233-238. 2003.

Paylor, R., Spencer, C. M., Yuva-Paylor, L. A. e Pieke-Dahl, S. The use of behavioral test batteries, II: Effect of test interval. Physiology &

Behavior, v.87, n.1, p.95-102. 2006.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. e Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods, v.14, n.3, p.149-167. 1985.

Pereira, J. K., Vieira, R. J., Konishi, C. T., Ribeiro, R. A. e Frussa-Filho, R. The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. Life Sci, v.65, n.10, p.PL101-107. 1999.

Perez De La Mora, M., Lara-Garcia, D., Jacobsen, K. X., Vazquez-Garcia, M., Crespo-Ramirez, M., Flores-Gracia, C., Escamilla-Marvan, E. e Fuxe, K. Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. Eur J Neurosci, v.23, n.10, p.2749-2759. 2006.

Platel, A. e Porsolt, R. D. Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. Psychopharmacology (Berl), v.78, n.4, p.346-352. 1982.

Pogorelov, V. M., Lanthorn, T. H. e Savelieva, K. V. Use of a platform in an automated open-field to enhance assessment of anxiety-like behaviors in mice. J Neurosci Methods, v.162, n.1-2, p.222-228. 2007.

Prut, L. e Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol, v.463, n.1-3, p.3-33. 2003.

Ramos, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci, v.29, n.10, p.493-498. 2008.

Ramos, A., Berton, O., Mormède, P. e Chaouloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. Behav Brain Res, v.85, n.1, p.57-69. 1997.

Ramos, A. e Mormède, P. Stress and emotionality: a multidimensional

and genetic approach. Neurosci Biobehav Rev, v.22, n.1, p.33-57. 1998.

Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D. e Izidio, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. Behav Brain Res, v.193, n.2, p.277-288. 2008.

Rang, H. P., Dale, M. M. e Ritter, J. M. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

Rodgers, R. J. Animal models of 'anxiety': where next? Behav Pharmacol, v.8, n.6-7, p.477-496; discussion 497-504. 1997.

Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A. e Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. Braz J Med Biol Res, v.30, n.3, p.289-304. 1997.

Rodgers, R. J., Cole, J. C., Aboualfa, K. e Stephenson, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.52, n.4, p.805-813. 1995.

Rodgers, R. J., Lee, C. e Shepherd, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. Psychopharmacology (Berl), v.106, n.1, p.102-110. 1992.

Rodgers, R. J. e Shepherd, J. K. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. Psychopharmacology (Berl), v.113, n.2, p.237-242. 1993.

Roy, V., Chapillon, P., Jeljeli, M., Caston, J. e Belzung, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. Psychopharmacology (Berl), v.203, n.1, p.131-141. 2009.

Sanchez, C. Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box. Eur Neuropsychopharmacol,

v.7, n.4, p.283-288. 1997.

Silva, R. C. e Brandão, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. Pharmacol Biochem Behav, v.65, n.2, p.209-216. 2000.

Silva, R. H. e Frussa-Filho, R. The plus-maze discriminative avoidance task: a new model to study memory-anxiety interactions. Effects of chlordiazepoxide and caffeine. J Neurosci Methods, v.102, Jul, p.117-125. 2000.

Stern, C. A., Carobrez, A. P. e Bertoglio, L. J. Aversive learning as a mechanism for lack of repeated anxiolytic-like effect in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.90, n.4, p.545-550. 2008.

Takao, K. e Miyakawa, T. Light/dark transition test for mice. J Vis Exp, n.1, p.104. 2006.

Treit, D., Menard, J. e Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav, v.44, n.2, p.463-469. 1993.

Valle, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. Am J Psychol, v.83, n.1, p.103-111. 1970.

Vargas, K. M., Da Cunha, C. e Andreatini, R. Amphetamine and pentylenetetrazole given post-trial 1 enhance one-trial tolerance to the anxiolytic effect of diazepam in the elevated plus-maze in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.30, n.8, p.1394-1402. 2006.

Vendruscolo, L. F., Takahashi, R. N., Bruske, G. R. e Ramos, A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. Psychopharmacology (Berl), v.170, n.3, p.287-293. 2003.

Wahlsten, D., Bachmanov, A., Finn, D. A. e Crabbe, J. C. Stability of inbred mouse strain differences in behavior and brain size between laboratories and across decades. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.44, p.16364-16369. 2006.

Walsh, R. N. e Cummins, R. A. The Open-Field Test: a critical review. Psychol Bull, v.83, n.3, p.482-504. 1976.

WHO – World Health Organization. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. Bull World Health Organ, v.78, n.4, p.413-426. 2000.

Wisłowska-Stanek, A., Zienowicz, M., Lehner, M., Taracha, E., Bidzinski, A., Maciejak, P., Skórzewska, A., Szyndler, J. e Pláznik, A. Midazolam inhibits neophobia-induced fos expression in the rat hippocampus. J Neural Transm, v. 113, p. 43-48. 2006.

Zangrossi Jr, H. e Graeff, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. Brain Res Bull, v.44, n.1, p.1-5. 1997.

Zhang, S. e Cranney, J. The role of GABA and anxiety in the reconsolidation of conditioned fear. Behav Neurosci, v.122, n.6, p.1295-1305. 2008.